

# **Expression von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in humanen Gliomen unterschiedlicher Malignität**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Katja Preußat**  
geboren am 13. Februar 1979 in Sondershausen

06. Oktober 2005

Erster Gutachter: Prof. S. Patt  
Zweiter Gutachter: Prof. G. Reifenberger  
Dritter Gutachter: Prof. S.H. Heinemann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.05.2006

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
A	Diffuses Astrozytom
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase
AP	Aktionspotenzial
AT	Annealing Temperatur
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAMR	<i>Centre for Applied Microbiology &amp; Research, USA</i>
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanosin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GB	Glioblastom
GG	gesundes Gehirngewebe (Kontrollgewebe)
H/E	Hämatoxylin/Eosin
hEAG	humaner EAG-Kanal ( <i>ether-a-gogo</i> )
HEK	<i>human embryonal kidney cell line</i> (menschliche embryonale Nierenzelllinie) 293
hERG	humaner ERG Kanal ( <i>eag-related</i> )
IUPHAR	<i>International Union of Pharmacology</i>
JC	<i>Jurkat Cell Line</i> (T-Lymphozytenzelllinie)
K <sub>Ca2+</sub>	calciumabhängige K <sup>+</sup> -Kanäle

## Abkürzungsverzeichnis

---

KCN-System	Nomenklatur zur Einteilung von Kaliumkanälen bzw. der klonierten Gene
Kir	Kanäle mit einwärts gerichteten K <sup>+</sup> -Strom
Kv- Kanäle	spannungsabhängige Kaliumkanäle
Kv1.X	spannungsabhängiger Kaliumkanal, Familie 1, Subtyp X
IK	calciumabhängiger Kaliumkanal mit intermediärer Leitfähigkeit
IP3	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LB-Agar/Medium	Luria-Bertani-Agar/Medium
M	männlich
mGw	Mittlerer Grauwert
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N2	Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OA	Oligoastrozytom
P	Pore
pA	Pilozytisches Astrozytom
PCR	<i>Polymerase-Chainreaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RMP	Ruhemembranpotential
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomal-Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chainreaction</i>
RVD	<i>regulatory volume decrease</i> , Volumenabfall
S (1)	Segment (Nummer 1)
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodezylsulfat)
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
TMD	transmembranäre Domäne

## Abkürzungsverzeichnis

---

Tris	Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan
UCSC	University of California, Santa Cruz
W	weiblich
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Einteilung und Epidemiologie von Gliomen.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Astrozytäre Tumore.....</b>	<b>6</b>
2.1.1.1	Astrozytome .....	6
2.1.1.1.1	Pilozytisches Astrozytom.....	7
2.1.1.1.2	Diffuses Astrozytom .....	7
2.1.1.1.3	Anaplastisches Astrozytom.....	8
2.1.1.2	Glioblastom .....	8
<b>2.1.2</b>	<b>Oligodendrogliale Tumore .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Oligoastrozytäre Mischgliome .....</b>	<b>10</b>
2.1.3.1	Oligoastrozytom .....	10
2.1.3.2	Anaplastisches Oligoastrozytom .....	10
<b>2.2</b>	<b>Kaliumkanäle .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Struktur .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Nomenklatur.....</b>	<b>13</b>
2.2.2.1	Kv1 ( <i>Shaker</i> )-Kanäle .....	16
2.2.2.2	eag-Kanäle.....	17
<b>2.2.3</b>	<b>Bedeutung der spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle für zellbiologische Prozesse.....</b>	<b>18</b>
2.2.3.1	Proliferation.....	19
2.2.3.2	Differenzierung .....	21
2.2.3.3	<i>Shaker</i> -Kanäle .....	22
<b>2.2.4</b>	<b>Onkogenes Potential .....</b>	<b>23</b>
2.2.4.1	Bedeutung der eag-Kanäle für die Tumorgenese.....	24
2.2.4.1.1	hEAG1 .....	24
2.2.4.1.2	hERG1.....	25
<b>2.2.5</b>	<b>Kaliumkanäle in Gliomen .....</b>	<b>25</b>

---

<b>3</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
4.1	Material.....	28
4.1.1	Gewebeproben.....	28
4.1.2	Zelllinien .....	30
4.1.3	Chemikalien (Tabelle 4.3) .....	30
4.1.4	Medien, Puffer und Lösungen .....	32
4.1.5	Oligonukleotide (Primer) .....	33
4.1.6	Kits und Enzyme (Tabelle 4.5).....	34
4.1.7	Geräte (Tabelle 4.6) .....	34
4.1.8	Software und Internetdatenbanken (Tabelle 4.7) .....	34
4.2	Methode .....	34
4.2.1	Isolation totaler RNA.....	35
4.2.2	Reverse Transkription.....	37
4.2.3	PCR-Experimente .....	38
4.2.3.1	Äquilibration anhand eines GAPDH-Standards .....	39
4.2.3.2	Bestimmung der Primersequenzen.....	41
4.2.3.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	42
4.2.3.4	Kanalspezifische PCR.....	43
4.2.4	Elektrophorese .....	44
4.2.5	Kontrolle der Identität der PCR-Produkte .....	45
4.2.5.1	Gelelution.....	45
4.2.5.2	Klonierung.....	45
4.2.5.3	Plasmidpräparation.....	45
4.2.5.4	Sequenzierung .....	45
4.2.6	Methoden zur Auswertung.....	46
4.2.6.1	Densitometrische Messungen.....	46
4.2.6.2	Statistische Methoden .....	47
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>48</b>

---

<b>5.1</b>	<b>Kaliumkanäle im nicht-neoplastischen Untersuchungsmaterial und in Zelllinien .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Gesundes Gehirngewebe .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Zelllinien .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2</b>	<b>Kaliumkanäle in Gliomen .....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Kv1.3 .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Kv1.5 .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2.3</b>	<b>hEAG1.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.4</b>	<b>hERG1.....</b>	<b>57</b>
<b>5.3</b>	<b>Vergleich Oligoastrozytom WHO-Grad II / anaplastisches Oligoastrozytom WHO-Grad III.....</b>	<b>59</b>
<b>5.4</b>	<b>Vergleich zwischen gesundem Gehirngewebe und Tumorgewebe.....</b>	<b>59</b>
<b>5.5</b>	<b>Sequenzierung .....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>63</b>
<b>6.1</b>	<b>Bemerkungen zur Methodik .....</b>	<b>64</b>
<b>6.2</b>	<b>Spannungsabhängige Kaliumkanäle im nicht-neoplastischen Untersuchungsmaterial .....</b>	<b>64</b>
<b>6.2.1</b>	<b>Gesundes Gehirngewebe .....</b>	<b>64</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Zelllinien .....</b>	<b>66</b>
<b>6.3</b>	<b>Spannungsabhängige Kaliumkanäle in Gliomen.....</b>	<b>66</b>
<b>6.3.1</b>	<b>Expression von Kv1.3 und Kv1.5 in Gliomen.....</b>	<b>67</b>
6.3.1.1	Differenzierte Expression zwischen den Tumorentitäten .....	67
6.3.1.2	(Kv1) Shaker-Kanäle und ihr Bezug zu Proliferation und Differenzierung von Zellen.....	68
6.3.1.3	Markerfunktion von Kv1.5? .....	70
<b>6.3.2</b>	<b>Expression von hEAG1 und hERG1 in Gliomen.....</b>	<b>71</b>
6.3.2.1	hEAG1 - eine Bedeutung für Gliome? .....	71
6.3.2.2	hERG1- eine essentielle Bedeutung auch für Tumore des ZNS? .....	73
<b>6.4</b>	<b>Niedrigere Ionenkanalexpressionsstärken in malignen und höhere in benignen Gliomen – ein generelles Phänomen? .....</b>	<b>74</b>



<b>6.5</b>	<b>Individuelle Fälle zurückführbar auf ein „aberrantes“ Ionenkanalexpressionsprofil? .....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>94</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>94</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>95</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>96</b>

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Spannungsaktivierte Kaliumkanäle ermöglichen Kaliumionen die Passage der Zellmembran entlang eines Konzentrationsgradienten in Abhängigkeit von der Membranspannung. Kaliumkanäle sind ubiquitär auf sehr unterschiedlichen Zelltypen vorhanden. Ihre wichtigste Funktion ist die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials. Sie sind für die Erregbarkeit von Zellen durch Membranrepolarisation, für die Frequenzmodulation von Aktionspotentialen und für die Regulation der  $K^+$ -Homöostase verantwortlich.

Im ZNS sind verschiedene Isoformen der spannungsabhängigen Kanäle in großer Dichte und Vielfalt nachweisbar (u.a. Kv1.1-1.6, Kv1.7, hEAG1, hERG1). Ihre Verteilung ist inter- und intrazellulär unterschiedlich. In Gliazellen konnte eine Rolle bei der Zellproliferation nachgewiesen werden. Andere Isoformen scheinen in der Tumorgene- und im malignen Wachstum involviert zu sein. Auch in Gliomen konnten mittels elektrophysiologischer Untersuchungen spannungsabhängige Kaliumkanäle nachgewiesen werden. Ihre funktionelle Rolle ist dort jedoch unklar.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der mRNA-Expression der Kanäle Kv1.3, Kv1.5, hEAG1 und hERG1 in 17 Gliomen unterschiedlicher Malignität sowie einer tumorfreien Hirngewebsprobe mittels RT-PCR. Die Fragestellung war, ob eine Abhängigkeit zwischen Kanalexpression und Malignitätsgrad von Gliomen nachzuweisen ist und ob sich dadurch Hinweise auf die Bedeutung der Kanäle für diese Hirntumorentität ergeben.

Die Kanalausstattung der tumorfreien Probe entsprach der aktuellen Literatur, sämtliche untersuchten Isoformen waren amplifizierbar.

Auch in den Gliomen wurden alle Kanäle exprimiert. Die Kanalexpressionsmuster der Gliome waren von dem der nicht-neoplastischen Gewebeprobe sowie untereinander verschieden. In den Gliomen waren die Kanäle Kv1.5 und hERG1 am stärksten nachweisbar, gefolgt von hEAG1, die schwächste Expression zeigte Kv1.3. Korrelationen der Signalstärke mit dem Tumormalignitätsgrad und der Histologie waren bei Kv1.5, hEAG1 und hERG1 erkennbar. Tendenziell waren in Gliomen von *niedrigem* WHO-Grad *stärkere* Kanalexpressionen und in *höhergradigen* Gliomen *geringere* Expressionssignale nachweisbar. Diese Unterschiede waren zum Teil statistisch signifikant. Dieses „inverse Muster“ konnte in Untersuchungen für Natriumkanäle ebenfalls gefun-

den werden (Schrey et al. 2002). Möglicherweise ist diese Suppression intrinsischer Kanalaktivitäten in Gliomen ein generelles Phänomen und kann als Marker genutzt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Hypothese – auch in Beziehung zum klinischen Verlauf – zu testen.

Kv1.3 zeigte kein spezifisches Expressionsmuster. Eine zelldifferenzierungsabhängige Korrelation, wie sie in Mikrogliazellen beschrieben wurde, kann somit nicht auf Gliomzellen übertragen werden.

Ob die Isoform Kv1.5 mit ihrer relativ stärkeren Expression in niedriggradigen Gliomen, d.h. also in höher differenzierten Tumoren, möglicherweise als „Differenzierungsmarker“ genutzt werden könnte, erfordert weitere Untersuchungen. Ferner ist eine Abklärung lohnenswert, ob ihre Expression im Zusammenhang mit einem besseren klinischen Outcome steht und etwaige Korrelationen mit einer günstigeren Prognose nachweisbar sind, wie es für andere Kanalarten bereits beschrieben wurde (besseres klinisches Outcome bei Medulloblastomen mit bestimmter Genexpression, Pomeroy et al. 2002).

Hinweise auf ein *onkogenes Potential* von hEAG1 (Überexpression in Tumoren, vgl. Pardo et al. 1999) liessen sich für einen Teil der humanen Gliome teilweise finden: die hEAG1-Expression war in einzelnen Gliomen erhöht. Allerdings fand sich kein Nachweis einer erhöhten Expression *nur* in höhermalignen Tumoren, im Gegenteil, dort fand sich sogar eine verminderte Expression.

Bezüglich hERG1 korreliert die hohe Expression in Astrozytomen mit dem in der Literatur vermuteten hERG-assoziierten selektiven Vorteil für das Tumorstadium. Auf Grund einer verminderten Expression in höhermalignen Gliomen ist die Bedeutung des Kanals allerdings für das *maligne* Wachstum von Hirntumoren fraglich. Anscheinend muss hinsichtlich seiner Funktion in Gliomen von der in nicht-neuralen Tumoren unterschieden werden.

## 2 EINLEITUNG

Ionenkanäle sind Membranbestandteile nahezu jeder Zelle. Sie sind als multimere porenbildende Proteinkomplexe aufgebaut, welche jeweils mehrere transmembranäre Domänen ausbilden.

Grundlage für die Einteilung und Nomenklatur der Ionenkanäle ist die Art des passierenden Ions sowie die Steuerung des Öffnungsverhaltens des Kanalproteins (Ligandenbindung, pH-Wert-Änderung, mechanische Deformierung, Spannungsänderung).

K<sup>+</sup>-Kanäle sind Proteine, die Kaliumionen die Passage der Zellmembran entlang eines Konzentrationsgradienten in Abhängigkeit von der Membranspannung ermöglichen. Im ZNS sind K<sup>+</sup>-Kanäle in großer Dichte und Vielfalt vorhanden. Sie sind in erster Linie für die Kontrolle der Erregbarkeit der Zellen durch Repolarisation der Membran und Frequenzmodulation von Aktionspotentialen verantwortlich, aber auch für die Regulierung des Ruhemembranpotentials und die K<sup>+</sup>-Homöostase (Sontheimer 1994, Newman et al. 1995).

Der zuerst klonierte und meistuntersuchte spannungsabhängige Kaliumkanal ist der sogenannte *Shaker*-Kanal (Kv1) aus einer Mutante von *Drosophila melanogaster* (Kamb et al. 1987). Mittlerweile können zahlreiche Isoformen, das heißt in ihrer Proteinstruktur verschiedene Subtypen, abgegrenzt werden. Zur Kv1-Familie gehören die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kanalisformen Kv1.3 und Kv1.5. Die zudem untersuchten Isoformen hEAG1 und hERG1 werden der eag-Familie zugeordnet. Das erste Mitglied der eag-Familie wurde ebenso aus Mutanten von *Drosophila melanogaster* kloniert: der sogenannte *ether-à-go-go*-Kanal (EAG) (Warmke et al. 1991).

Gliome exprimieren, wie andere humane Hirntumore, eine große Vielfalt an spannungsabhängigen Ionenkanälen: spannungssensitive K<sup>+</sup>-Kanäle (Kv), Kanäle mit einwärtsgerichtetem K<sup>+</sup>-Strom (Kir) oder calciumabhängige K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>Ca2+</sub>) (Pallota 1987, Brismar und Collins 1989a, 1989b, 1989c, Brismar 1995, Ransom 2001).

Trotz ihrer bekannten Expression in Gliomzellen ist die funktionelle Rolle von spannungsabhängigen Kaliumkanälen nicht vollständig geklärt. Diese Arbeit geht der Frage nach, ob es eine Abhängigkeit zwischen Kanalexpression und Malignitätsgrad oder histologischen Subtypen von Gliomen gibt.

## 2.1 Einteilung und Epidemiologie von Gliomen

Hirntumore werden in neuroepitheliale Tumoren, Tumoren der Meningen, der Sella-region, Keimzelltumoren, Lymphome und Metastasen (Kleihues und Cavenee 2000) eingeteilt. Ihr Anteil an sämtlichen Tumorerkrankungen beträgt je nach Statistik 1 bis 4% (Jänisch et al. 1988). Unter primären Hirntumoren versteht man diejenigen Neoplasien, die sich von den Zelltypen des Hirnparenchyms und ZNS-assoziierten Gewebes im engeren Sinne ableiten (Wiestler und von Deimling 1995). Unter den neuroepithelialen Tumoren gehören Gliome mit einer relativen Häufigkeit von 45% zu den häufigsten hirneigenen Neoplasien. Die astrozytären Tumoren bilden den Hauptanteil an den vorkommenden hirneigenen Tumoren. Einen Überblick über die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Tumoren gibt Tabelle 2.1.

**Tabelle 2.1: Häufigkeitsverteilung von Hirntumoren, modifiziert nach Kleihues et al. (1997)**

Bezeichnung	Anteil an allen Hirntumoren
Astrozytome	30%
Oligodendrogliome	5%
Ependymome	5%
meningeale Tumoren	15%
embryonale Tumoren	5%
Lymphome	<2%
Metastasen	25%
Plexustumoren	<1%
Pinealistumoren	<2%
Neuronale Tumoren	<3%
sonstige Tumoren	~8%

Nach der WHO-Klassifikation von Hirntumoren (Kleihues und Cavane 2000) werden die Gliome in vier Malignitätsgrade eingeteilt. Folgende histopathologischen Parameter werden dem zugrundegelegt: Tumorzelldichte, Zell- und Kernpolymorphie, mitotische Aktivität, Tumorgewebsnekrosen und Gefäßproliferate (Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2: Histopathologische Parameter der Malignitätsgrade von Gliomen nach WHO**

Parameter	Grad I*	Grad II	Grad III	Grad IV
<b>Zelldichte</b>	+	++	+++	++++
<b>Polymorphie</b>	+ / ++	0 / +	+++	++++
<b>Mitosen</b>	0	0 / +	++ / +++	+++
<b>Nekrosen</b>	0	0	++ / +++	++++
<b>Endothelproliferation</b>	+	0	++ / +++	+++**

0=fehlend, += gering, ++= mäßig, +++= mittel, ++++ = hoch; \* dieser WHO-Grad gilt nur für pilozytische Astrozytome; \*\* häufig in Form von Gefäßglomerula.

Dabei entspricht ein hochdifferenzierter, langsam wachsender Gehirntumor mit einer günstigen Prognose dem WHO-Grad I, während WHO-Grad IV einen außerordentlich aggressiven, schnell wachsenden Tumor mit ungünstiger Prognose darstellt (Wiestler und von Deimling 1995). Dieses Gradierungsschema erlaubt Aussagen über die biologische Wertigkeit und den wahrscheinlichen Verlauf eines individuellen Hirntumors und ist für die Prognosebeurteilung wesentlich. Tabelle 2.3 zeigt die durchschnittliche Lebenserwartung von Patienten mit Astrozytomen. Die Prognose von Hirntumoren wird außer durch den histologischen Malignitätsgrad auch entscheidend von der Lokalisation, der Ausdehnung, dem Alter und dem Allgemeinzustand des Patienten bestimmt (Paulus 2002).

Nach der WHO-Klassifikation werden die Gliome in die Familien der astrozytären und oligodendroglialen Tumoren sowie Mischgliomen (Oligoastrozytome) und Ependymomen eingeteilt. Die zugehörigen Tumorentitäten sind in Tabelle 2.4 dargestellt. Auf die Ependymome wird in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen, da zu dieser Tumorgruppe keine Untersuchungen durchgeführt wurden.

**Tabelle 2.3: Mittlere Überlebenszeit von Patienten mit Astrozytomen unterschiedlichen WHO-Grades (nach Greenberg, 2001)**

WHO-Grad	Mittlere Überlebenszeit (Jahre)
<b>I</b>	8-10
<b>II</b>	5-8
<b>III</b>	~2
<b>IV</b>	<1

**Tabelle 2.4: WHO-Klassifizierung der Gliome\***

Tumorfamilie	Tumorentität	WHO-Grad
Astrozytäre Tumoren	<b>Pilozytisches Astrozytom</b>	<b>I</b>
	<b>Diffuses Astrozytom</b>	<b>II</b>
	<i>Varianten: fibrillär, protoplasmatisch, gemistozytisch</i>	
	Anaplastisches Astrozytom	<b>III</b>
	<b>Glioblastom</b>	<b>IV</b>
	<i>Varianten: Riesenzellglioblastom, Gliosarkom</i>	
	Pleomorphes Xanthoastrozytom	<b>II</b>
Oligodendrogliale Tumore	Subependymales Riesenzellastrozytom	<b>I</b>
	Oligodendrogliom	<b>II</b>
	Anaplastisches Oligodendrogliom	<b>III</b>
Mischgliome	<b>Oligoastrozytom</b>	<b>II</b>
	Anaplastisches Oligoastrozytom	<b>III</b>

\* Ependymome wurden nicht berücksichtigt (modifiziert nach Radner et al. 2002); **fett markierte Tumorentitäten:** die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Entitäten

Als besondere Eigenschaften der Gliome sind die Infiltrationsneigung in das umgebende Gehirngewebe unabhängig von der histologischen Wertigkeit der Tumoren, das Risiko der malignen Entartung primär gutartiger astrozytärer Gliome (sog. Tumorprogression) und die daraus folgenden ungünstigen Heilungschancen zu nennen (Wiestler und von Deimling 1995).

### 2.1.1 Astrozytäre Tumore

Unter den Begriff astrozytäre Tumore fallen die Astrozytome und in der neuen WHO-Klassifikation (Kleihues und Cavenee 2000) ebenfalls das Glioblastom, welches zuvor den embryonalen Tumoren zugeordnet wurde (Wiestler und Schmidt 1998).

#### 2.1.1.1 Astrozytome

Astrozytome bilden einen Anteil von 30% aller Hirntumoren (Kleihues et al. 1997). Als Ursprungszellen werden Zellen der Astroglia angenommen. Laut WHO können das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I), das diffuse Astrozytom (WHO-Grad II) und das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) unterschieden werden (Tabelle 2.4).

### 2.1.1.1.1 Pilozytisches Astrozytom

Das pilozytische Astrozytom (Grad I WHO) ist ein Tumor des jungen und mittleren Erwachsenenalters (mittleres Manifestationsalter 20 Jahre) und tritt hauptsächlich im Kleinhirn und den Mittellinienstrukturen des Großhirns auf. Von klinischer Bedeutung ist die gute Prognose dieser Astrozytomvariante: die 5- und 20-Jahresüberlebensraten liegen bei über 85%, bei kompletter Entfernung sind Dauerheilungen möglich (Paulus 2002). Die pilozytischen Astrozytome tendieren nicht zu einem destruierenden, aggressiven Wachstum.

Makroskopisch ist dieser Tumor relativ gut abgegrenzt, hat ein meist blassgelbes Aussehen und kann derb, schwammig-weich oder von umfangreichen Zysten durchsetzt sein.

Als mikroskopische Charakteristika gelten das biphasische Muster aus isomorphen bipolaren, in Zügen parallel verlaufenden Tumorzellen und mikrozystischen Arealen sowie die sogenannten Rosenthal-Fasern und eosinophilen Granularkörperchen, sogenannte Proteindroplets (Paulus 2002) (Abbildung 2.1A).

### 2.1.1.1.2 Diffuses Astrozytom

Ca. 10-15% aller astrozytären Hirntumoren gehören dieser Gruppe an, die Inzidenz liegt bei 1,4 pro 1 Mio. Einwohner und Jahr.

Das diffuse Astrozytom (Grad II WHO) ist ein Tumor mit hochdifferenzierten Tumorzellen und kann in den histopathologischen Varianten fibrillär, gemistozytisch und protoplasmatisch auftreten (Tabelle 2.4). Dieser niedergradige Tumor tritt hauptsächlich im frühen und mittleren Erwachsenenalter auf (Wiestler und von Deimling 1995). Hinsichtlich des mittleren Manifestationsalters und der Überlebensraten gibt es zwischen den einzelnen histopathologischen Varianten unterschiedliche Angaben (Paulus 2002). Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung wird mit etwa 5 Jahren angegeben (Wiestler und von Deimling 1995). Diffuse Astrozytome wachsen bevorzugt in supratentoriellen Lokalisationen, meist im Frontal- und Temporallappen. Als makroskopische Merkmale werden das diffus aufgetriebene Gewebe, die leichte Rosatönung im frischen Schnitt sowie die zäh-elastische oder gummiähnliche Konsistenz dieser nicht selten zystischen Tumore beschrieben (Paulus 2002). Der hohe Differenzierungsgrad (die Tumorzellen sind nach Art fibrillärer oder gemistozytischer Astrozyten differenziert), die Bildung von Mikrozysten sowie das allenfalls vereinzelte Auftreten



von Kernatypien sind als histopathologische Merkmale dieses Großhirntumors zu nennen (siehe Abbildung 2.1B,C).

Im Gegensatz zum pilozytischen Astrozytom ist ein diffus-infiltrierendes Wachstum in die umgebenden Gehirnstrukturen charakteristisch. Insbesondere gemistozytenreiche diffuse Astrozytome zeigen eine Tendenz zur Malignisierung, d.h. zum Progress zu einem höheren WHO-Grad, ein Prozess, der sich limitierend auf die mittlere Überlebenszeit auswirkt.

### 2.1.1.1.3 Anaplastisches Astrozytom

Dieser Tumor wird zu den malignen Gliomen vom WHO-Grad III gezählt und zeichnet sich durch eine Anaplasie und gesteigerte Proliferationstendenz aus. Meist entsteht der Tumor aus niedriggradigen Gliomen und hat zusätzlich die Tendenz, zum Glioblastom fortzuschreiten. Das mittlere Manifestationsalter beim anaplastischen Astrozytom liegt bei 50 Jahren. Es stellt einen Anteil von 35% an allen Astrozytomen dar (Paulus 2002). Die Überlebensraten dieses vorwiegend in den Großhirnhemisphären lokalisierten Tumors sind schlechter als beim Astrozytom Grad II WHO (siehe Tabelle 2.3) (Greenberg 2001). Aufgrund ihrer Lokalisation in den Großhirnhemisphären können sie ähnlich den diffusen Astrozytomen zu einer Auftreibung anatomischer Strukturen führen.

Histologisch kennzeichnend für das anaplastische Astrozytom sind eine vermehrte Zelldichte, eine erhöhte Zell- und Kernpolymorphie, eine signifikante Mitose- und Proliferationsaktivität und beginnende Gefäßproliferate (Wiestler und Schmidt 1998). Die Abgrenzung von einem noch niedriggradigen Astrozytom (WHO-Grad II) kann schwierig sein, wobei man der erhöhten Mitose- und Proliferationsaktivität entscheidende Bedeutung beimißt (Wiestler und Schmidt 1998).

### 2.1.1.2 Glioblastom

Die Glioblastome (Grad IV WHO) gehören zu den bösartigsten und häufigsten Hirntumoren (12-20% der Hirntumore). Sie umfassen etwa 40% der Gliome. Die Inzidenz in Europa und Nordamerika beträgt 2-3 pro 100.000 Einwohner und Jahr, das mittlere Manifestationsalter wird mit 55 Jahren angegeben. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (m:w= 3:2) (Paulus 2002).

Der Tumor besitzt unter den Gliomen die schlechteste Prognose. Ein Grund dafür ist die rasche und weitreichende Ausbreitung entlang vorbestehender Bahnen im ZNS. Die 2-

Jahresüberlebensrate beträgt 5-12%, die mediane Überlebensrate unter gegenwärtiger Standardtherapie 8-14 Monate (Paulus 2002).

Die bevorzugte Lokalisation dieses Hirntumors ist das Marklager der Großhirnlappen. Häufig breitet er sich in den Kortex, die Stammganglien und schmetterlingsförmig über den Balken auf die Gegenseite aus. Makroskopisches Charakteristikum ist die bunte Schnittfläche, bedingt durch ein Nebeneinander von soliden Tumorpartien, Nekrosen sowie Blutungen. Als klassische histopathologische Merkmale können die hohe Zelldichte mit ausgeprägter Zell- und Kernpolymorphie, die Kernatypien, die starke mitotische Aktivität, die deutlich ausgeprägten Gefäßproliferate sowie die ausgedehnten Nekrosen (sog. strichförmige Nekrosen mit Pseudopalisadenstellung der umgebenden Tumorzellkerne) genannt werden (Paulus 2002) (siehe Abbildung 2.1E,F).

Man unterscheidet primäre Glioblastome (meist bei älteren Patienten) und sekundäre Glioblastome, welche aus einem Grad-II- oder Grad-III-Astrozytom entstanden sind (häufig bei jüngeren Patienten). Beide Glioblastom-Subtypen unterscheiden sich genetisch (Kleihues und Ohgaki 2000, Paulus 2002).

### **2.1.2 Oligodendrogliale Tumore**

Als Ursprungszellen der oligodendroglialen Tumore werden Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen angesehen (DeAngelis 2001). Das gut differenzierte Oligodendrogliom (Grad II WHO) und das anaplastische Oligodendrogliom (Grad III WHO) fallen unter diese Tumorgruppe (Tabelle 2.4).

Das Oligodendrogliom des Grades II WHO tritt als diffus infiltrierend wachsender Tumor des Erwachsenenalters vor allem in den Großhirnhemisphären auf. Das mittlere Manifestationsalter beträgt 40 Jahre, die 5- bzw. 20- Jahresüberlebensraten betragen 40-75% bzw. 15% (Paulus 2002). Makroskopisches Merkmal ist eine weiche, graue, gelegentlich körnige oder zystische Schnittfläche (Paulus 2002). Histopathologisches Charakteristikum ist die sogenannte Honigwabenstruktur (siehe Abbildung 2.1D) mit relativ gleichförmigen, abgerundeten, hyperchromatischen Kernen und einem klaren Zytoplasma mit prominenten Zellgrenzen (Radner et al. 2002). Des Weiteren können Mikrokalzifikationen sowie mukoid/zystische Degenerationen und charakteristischerweise ein maschenartig verzweigtes Kapillarnetz vorkommen (Paulus 2002, Radner et al. 2002).

Das anaplastische Oligodendrogliom des Grades III WHO ist ebenfalls ein Tumor des Erwachsenenalters und bevorzugt im Frontallappen des Großhirns lokalisiert. Der Tumor zeigt im wesentlichen noch die typischen histopathologischen Merkmale eines Oligodendroglioms wie die honigwabenähnliche Struktur ein fein verzweigtes Netz pathologischer Kapillaren und Verkalkungen (Wiestler und Schmidt 1998). Allerdings kommen Malignitätszeichen wie eine stark erhöhte Zelldichte, ausgeprägte Kernpolymorphie, zahlreiche Mitosen, Nekrosen oder pathologische Blutgefäßproliferate hinzu (Paulus 2002).

### **2.1.3 Oligoastrozytäre Mischgliome**

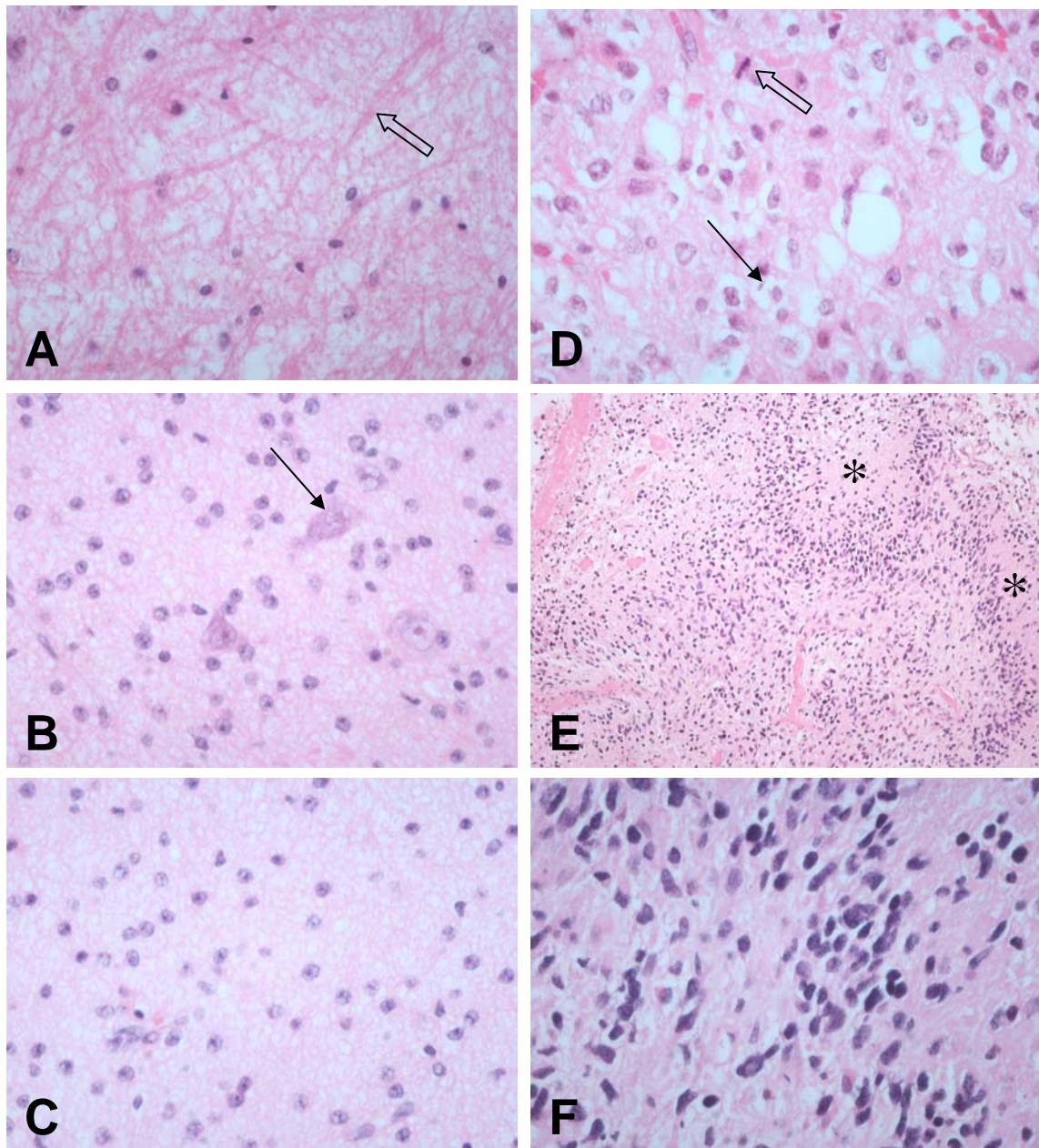
Bei dieser Tumorgruppe wird das Oligoastrozytom WHO-Grad II und das anaplastische Oligoastrozytom WHO-Grad III unterschieden (Tabelle 2.4). Diese Mischgliome bestehen aus histopathologisch unterschiedlich differenzierten Zellpopulationen, welche Charakteristika von Oligodendrogliomen und Astrozytomen aufweisen (siehe Abbildung 2.1D). Die verschiedenen Anteile liegen entweder in getrennten Regionen (biphasischer Typ) oder miteinander vermischt (diffuser Typ) vor (Wiestler und Schmidt 1998). Bei der astrozytären Komponente kommen sowohl fibrilläre als auch gemistozytische Zellformen vor (Radner et al. 2002). Makroskopisch unterscheiden sich diese Tumore kaum von anderen niedriggradigen Gliomen.

#### **2.1.3.1 Oligoastrozytom**

Das Oligoastrozytom (WHO-Grad II) ist ein Gliom des mittleren Alters (35 bis 45 Jahre), mit einer Inzidenz von ca. 0,1 pro 100.000 Einwohner und Jahr. Die Hauptlokalisationen dieses Mischglioms sind der Frontal- und Temporalbereich der Großhirnhemisphäre (Kleihues und Cavenee 2000).

#### **2.1.3.2 Anaplastisches Oligoastrozytom**

Kennzeichnend für das anaplastische Oligoastrozytom (WHO-Grad III) sind histologische Merkmale der Anaplasie einschließlich Kernatypien, Zellpleomorphie, hohe Zelldichte und hoher mitotischer Aktivität (siehe Abbildung 2.1D). Dieses Gliom ist ebenfalls in den Großhirnhemisphären lokalisiert und weist eine relativ schlechte Prognose, jedoch im Vergleich zum „rein“ anaplastischen Astrozytom eine bessere Prognose auf (Kleihues und Cavenee 2000).



**Abb. 2.1 Charakteristische HE-Histologie der untersuchten Gliome**

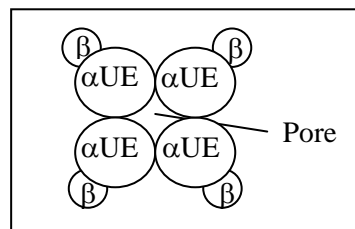
A: Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (Tumorprobe 1, vgl. Tabelle 4.1) mit geringer Zelldichte und piloiden Zellen. Der offene Pfeil kennzeichnet eine Rosenthalfaser. B, C: Diffuses Astrozytom WHO-Grad II (Tumor 4) mit moderater Zelldichte und reifen astrozytären Zellen, bei B mit Respektierung ortsständiger Neurone (Pfeil). D: Oligoastrozytom WHO-Grad III (Tumor 9) mit für Oligodendrogliome typischen Honigwaben (schmaler Pfeil) und einer Mitose (offener Pfeil). E, F: Glioblastom WHO-Grad IV (Tumor 15), Übersicht bei E mit strichförmigen Nekrosen (\*), stärkere Vergrößerung bei F mit unreifen, polymorphen Tumorzellen. A-D, F: x350, E: x87,5

## 2.2 Kaliumkanäle

Kaliumkanälen kommt ein großer Stellenwert in zell- und tumorbiologischen Prozessen zu (Dubois und Rouzaire-Dubois 1993, Nilius und Droogmans 1994, Brismar 1995, Wonderlin und Strobl 1996, Pardo et al. 1999). Den Mitgliedern der eag-Familie, hEAG1 (*human* EAG1) und hERG1 (*human* ERG1), gilt wegen ihres vermutlich onkogenen Potentials (Pardo et al. 1999) besonderes Interesse. Bei mehreren Vertretern der *Shaker*-Kanalfamilie (Kv1) wurde eine Beziehung zu Proliferation und Differenzierung nachgewiesen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Kanalisoforamen Kv1.3 und Kv1.5, welche beispielsweise in Mikroglia-Zellen ein zueinander gegenläufiges Expressionsverhalten in Abhängigkeit vom Differenzierungs- bzw. Aktivierungsstatus der Zellen aufweisen (Kotecha und Schlichter 1999).

### 2.2.1 Struktur

Kaliumkanäle bestehen aus vier porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten, die als Homo- und Heteromultimere (z.B. im ZNS) auftreten können. Die vier  $\alpha$ -Untereinheiten können zusätzlich mit je einer  $\beta$ -Untereinheit verbunden sein (Li et al. 1994, Dolly und Parcej 1996). (Abbildung 2.2).



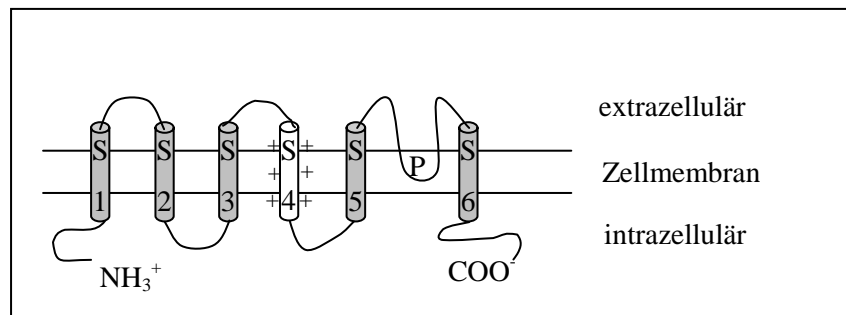
**Abbildung 2.2: Schema der tetrameren Anordnung der  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha$ -UE) eines spannungsabhängigen Kaliumkanals, von zytoplasmatischer Seite aus betrachtet.** An jeder  $\alpha$ -Untereinheit kann auf der zytoplasmatischen (intrazellulären) Seite eine  $\beta$ -Untereinheit ( $\beta$ ) assoziiert sein.

Jede  $\alpha$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals enthält sechs hydrophobe transmembranäre Domänen (S1-S6) und eine Verbindungsschleife (P-Segment / H5-Loop) zwischen den Segmenten S5 und S6, welche die Pore auskleidet. Die amino- und carboxyterminalen Enden des Proteins sind auf der intrazellulären Seite der Zellmembran lokalisiert (Abbildung 2.3). Bei einigen Kanälen sind an verschiedenen Stellen des Kanalproteins Domänen mit spezifischen Funktionen identifiziert worden, z.B.

bei eag-Kanälen eine Bindungsdomäne am carboxyterminalen Ende für zyklische Nukleotide (Bauer und Schwarz 2001).

Die verschiedenen Charakteristika des Kanalproteins können auf molekularer Ebene erklärt werden, sei es die Ionenselektivität und –permeation (Heginbotham et al. 1994), die Kinetik oder die Beeinflussbarkeit durch Pharmaka und Toxine.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kaliumkanäle der eag-Familie und Kv1-Familie sind spannungsabhängig (Brüggemann et al. 1993); die Aktivierung erfolgt durch Depolarisation der Zellmembran. Der Spannungssensor wurde strukturell dem stark positiv geladenen S4-Segment zugeordnet (Armstrong und Bezanilla 1973, Yang und Horn 1995, Yang et al. 1996, Smith-Maxwell et al. 1998).



**Abbildung 2.3: Schematische Struktur der  $\alpha$ -Untereinheit eines spannungssensitiven Kaliumkanals (modifiziert nach Bauer und Schwarz 2001)**

S1-6: transmembranäre Segmente 1-6; P: Segment P, alle 4 P-Segmente der  $\alpha$ -Untereinheiten formen die Kanalpore

### 2.2.2 Nomenklatur

Je nach Herleitungsgrundlage und Benennungsart existieren für Kaliumkanäle verschiedene Einteilungssysteme. Das Kv-System stellt eine Einteilung aufgrund der sechs transmembranären Domänen dar (Chandy 1991, Gutman und Chandy 1993). Anhand phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen wurden die Kanäle in Subfamilien zusammengefasst. In den letzten Jahren wurden neue Gene beschrieben, die nicht alle dem Kv-Schema zugeordnet werden konnten (Gutman et al. 2003). Parallel dazu hat sich die KCN-Nomenklatur entwickelt (White et al. 1997, Gutman et al. 2003). Nachteil dieses Einteilungssystems ist eine fehlende rationale Herleitungsgrundlage, teilweise werden Struktur und phylogenetische Beziehungen der Kanäle ignoriert (Gutman et al. 2003).

Aufgrund dieser Schwächen wird zur Zeit an einer einheitlichen und rationalen Nomenklatur gearbeitet, welche die architektonischen Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen Familien wie auch ihre phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen berücksichtigt. Wir beziehen uns hier auf den Klassifikations-Vorschlag der Internationalen Pharmakologischen Vereinigung (International Union of Pharmacology, IUPHAR), im Folgenden als IUPHAR-Nomenklatur bezeichnet (Review: Gutmann et al. 2003).

In der IUPHAR-Nomenklatur ergibt sich die Kanalbezeichnung (angelehnt an das Kv-System; Chandy 1991, Ertel et al. 2000, Goldin et al. 2001) aus dem bevorzugtem Ion ( $K^+$ ), dem Steuermechanismus bzw. den Strukturmerkmalen (z.B. v=voltage,  $Ca_{2+}$ =calciumabhängig, 2P=2 Poren), der Familie/Subfamilie (1.) und der spezifischen Isoform (.x). (Tabelle 2.5; Gutman et al. 2003).

Die Kanäle besitzen eine unterschiedliche Zahl von transmembranären Domänen (TMD) und Ionenporen (P). Man unterscheidet z.B. Kanäle mit sechs Domänen und einer Pore (6TMD/1P: Kv,  $K_{Ca_{2+}}$ ), vier Domänen und zwei Poren (4TMD/2P:  $K_{2P}$ ) oder zwei Domänen und einer Pore (2TMD/1P: Kir) (siehe Tabelle 2.5). Die Gruppe mit zwei Domänen besteht im Wesentlichen aus den sogenannten einwärts gleichrichtenden (inward-rectifying) Kaliumkanälen (Kir), welche Auswärtsströme generieren und an der Stabilisierung des Membranruhepotentials beteiligt sind.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kanäle gehören zur Gruppe der Kv1(Shaker)- und Kv10- bzw. Kv11-Subfamilie (nach IUPHAR-Klassifikation). Um jedoch den Vergleich mit der Literatur zu gewährleisten, werden in der vorliegenden Arbeit die ursprünglichen Bezeichnungen EAG1 (statt Kv10.1) und ERG1 (statt Kv11.1) gewählt.

**Tabelle 2.5: IUPHAR\*-Nomenklatur (wichtigsten Kanalfamilien)**

Strukturklasse	Familie	Subfamilie	Kanäle der Subfamilie (Bezeichnung der älteren Nomenklaturen)
6 TMD/ 1P	Kv	Kv1-6 + Kv8-9	Kv1= <i>Shaker</i> : Kv1.1-Kv1.8 z.B. <b>Kv1.3, Kv1.5</b> Kv2= <i>Shab</i> : Kv2.1, Kv2.2 Kv3= <i>Shaw</i> : Kv3.1-Kv3.4 Kv4= <i>Shal</i> : Kv4.1-4.3 Kv5: 5.1 (KCNF1) Kv6: 6.1-6.3 Kv8: 8.1 Kv9: 9.1-9.3
		Kv7	Kv7: 7.1-7.5 (KCNQ1-5)
		Kv10-12 (eag-Familie)	Kv10: Kv10.1 ( <b>EAG1</b> ), Kv10.2 (EAG2)
			Kv11: Kv11.1( <b>ERG1</b> )-11.3 (ERG3) Kv12: 12.1-12.3 (ELK1-3)
	K <sub>Ca2+</sub>	K <sub>Ca2+</sub> 2 + K <sub>Ca2+</sub> 3	K <sub>Ca2+</sub> 2: 2.1-2.3 (SK-Kanäle1-3) K <sub>Ca2+</sub> 3.1 (IK-Kanal1, SK-Kanal4)
		K <sub>Ca2+</sub> 1 + K <sub>Ca2+</sub> 4,5	K <sub>Ca2+</sub> 1: 1.1 (BK-Kanal, <i>slo</i> ) K <sub>Ca2+</sub> 4: 4.1; 4.2 ( <i>slack</i> ; <i>slack-related</i> ) K <sub>Ca2+</sub> 5: 5.1 ( <i>slo</i> -3, KCNMA1)
2 TMD/ 1P	Kir	Kir1-7	Kir1.1 (ROMK1) Kir2: 2.1-2.4 (IRK1-4) Kir3: 3.1-3.4 (GIRK1-4) Kir4: 4.1 (KAB-2, BIR10) 4.2 (ROMK2) Kir5.1 Kir6: 6.1 (uKATP-1), 6.2 (BIR) Kir7.1
2 P (4TMD/ 2P)	K <sub>2P</sub>	K <sub>2P</sub> 1.1-17.1	K <sub>2P</sub> 1.1 (TWIK-1) K <sub>2P</sub> 2.1 (TREK-1) K <sub>2P</sub> 3.1 (TASK-1) K <sub>2P</sub> 4.1 (TRAAK) K <sub>2P</sub> 5.1 (TASK-2) K <sub>2P</sub> 6.1 (TWIK-2) K <sub>2P</sub> 7.1 (KCNK7, kcnk8) K <sub>2P</sub> 9.1 (TASK-3) K <sub>2P</sub> 10.1 (TREK-2) K <sub>2P</sub> 12.1 (THIK-2) K <sub>2P</sub> 13.1 (THIK-1) K <sub>2P</sub> 15.1 (TASK-5) K <sub>2P</sub> 16.1 (TALK-1) K <sub>2P</sub> 17.1 (TASK-4, TALK-2)

TMD: transmembranäre Domäne; P: Pore; **fett gedruckt**: in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kanalisformen; \**International Union of Pharmacology*



### 2.2.2.1 Kv1 (*Shaker*)-Kanäle

Die bisher größte Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle ist die Gruppe der sogenannten *Shaker*-Kanäle (Kv1). Der *Shaker*-Kanal wurde aus einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* kloniert (Kamb et al. 1987). Es sind bisher acht Isoformen bekannt (Kv1.1-Kv1.8) (Übersicht siehe Gutman et al. 2003).

Die chromosomale Lokalisation der hier untersuchten Kaliumkanäle ist für Kv1.3 Chromosom #1p21 und für Kv1.5 Chromosom #12p13. Die Kanäle sind bei Ruhemembranpotential geschlossen und öffnen sich bei Depolarisation (Miller 1991, Grissmer et al. 1994). Elektrophysiologisch können sie zu den verzögernd-gleichrichtenden Kaliumkanälen ( $K_{DR}$ ) gezählt werden. Die verzögernd-gleichrichtenden (*delayed-rectifier*) Kaliumkanäle ( $K_{DR}$ ) aktivieren mit einer zeitlichen Verzögerung und inaktivieren langsam (C-Typ-Inaktivierung). Sie führen durch einen Ausstrom von Kaliumionen zu einer Repolarisation der Membran (Hille 1992).

Kv-Kanäle werden im ZNS in großer Dichte und Vielfalt exprimiert (Coleman et al. 1999). Alle Isoformen der Kv1-Subfamilie (Kv1.1-1.8) werden im ZNS mit unterschiedlichem Verteilungsmuster exprimiert (Übersicht siehe Gutman et al. 2003). So findet man den Kanal **Kv1.3** - der Häufigkeit nach absteigend - mit folgender Verteilung: Colliculus inferior > Bulbus olfactorius, Pons/Medulla > Mittelhirn, Colliculus superior, Corpus striatum, Hippocampus, zerebraler Cortex. Kv1.3 wird auch im Kleinhirn exprimiert (Chung et al. 2005). Neben erregbaren Zellen kommen die Kv1-Kanäle auch in nicht erregbaren Zellen wie T-Lymphozyten und Glia vor. In T-Lymphozyten spielt der Kanal Kv1.3 eine essentielle Rolle für die Zellaktivierung und gilt als therapeutisches Target für Immunsuppressiva. So konnte bereits eine selektive Blockade der Aktivierung von T-Lymphozyten erreicht werden (Cahalan und Chandy 1997, Koo et al. 1997, Cahalan et al. 2001). Ferner wurden im Tierversuch Wirkungen bei einer Form der autoimmunen Enzephalomyelitis (*adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis*), die dem Krankheitsbild der Multiplen Sklerose ähnelt, nachgewiesen. Durch selektive Kv1.3-Blockade konnte der Krankheitsverlauf günstig beeinflusst werden. Die Autoren versprechen sich aufgrund dieser Erfolge eine effektive Behandlungsmöglichkeit der Multiplen Sklerose (Beeton et al. 2001).

**Kv1.5** spielt am Herzen eine entscheidende Rolle. Er zeigt Eigenschaften, die dem ultra-schnellen Strom  $I_{Kur}$  (ultra-rapidly) am Herzen ähnlich sind. Mittels Antikörpern

konnte dieser Strom blockiert werden, was Möglichkeiten in der Behandlung von Vorhofflimmern eröffnet (Snyders et al. 1993, Feng et al. 1997, Van Wagoner et al. 1997, Brundel et al. 2001).

In Gliazellen, die aufgrund ihres negativen Membranpotentials und ihrer hohen Kaliumleitfähigkeit lange Zeit als elektrisch passiv galten, wurden spannungs- und ligandengesteuerte Ionenkanäle abhängig von Entwicklungsstadium, Zelltyp und der entsprechenden Hirnregion gefunden (Stuhmer et al. 1989, Swanson et al. 1990, Barres et al. 1990, Sontheimer und Waxman 1993, Sontheimer 1994, Verkhatsky 2000). Die vielfältige Funktion der spannungsabhängigen Kaliumkanäle ist abhängig vom Gewebetyp und noch nicht vollständig geklärt (siehe Abschnitt 2.2.4).

### 2.2.2.2 eag-Kanäle

Das erste Mitglied der eag-Familie wurde ebenfalls aus Mutanten von *Drosophila melanogaster* kloniert: der sogenannte *ether-à-go-go*-Kanal (EAG) (Warmke et al. 1991). Fruchtfliegen mit einer Mutation in diesem Gen fielen durch ein rhythmisches Schütteln der Beine unter Äthernarkose auf. Dies wurde als Hinweis auf die Funktion der Kanäle bei der Steuerung der neuronalen Erregbarkeit gedeutet.

Die eag-Familie besteht aus Kanälen mit Sequenzhomologien, den EAG- (*ether-à-go-go*), ERG- (EAG-related) und ELK-Kanälen (EAG-like) (Warmke und Ganetzky 1994). Die ersten bei Säugetieren klonierten eag-Kanäle waren EAG1 der Maus und ERG1 beim Menschen (hERG1: *human* ERG1) (Warmke und Ganetzky 1994). Mittlerweile sind weitere Kanäle bekannt, u.a. EAG2 (Saganich et al. 1999), ERG1, ERG2 und ERG3 (Shi et al. 1997) sowie ELK1-3 (Engeland et al. 1998, Shi et al. 1998). Die chromosomale Lokalisation der Gene ist für hEAG1 Chromosom #1q32 und für hERG1 Chromosom # 7q35.

Im Unterschied zu den Kv1-Kanälen zeichnen sich EAG-Kanäle durch eine Abhängigkeit von intrazellulären zyklischen Nukleotiden (cAMP) aus. Sie vereinen Merkmale von spannungsgesteuerten (mit dem Charakteristikum eines  $K_{DR}$ ; Meyer und Heinemann 1998) und ligandengesteuerten Kanälen (Warmke und Ganetzky 1994). Es besteht eine Abhängigkeit u.a. von  $[Mg^{2+}]_o$  (Verlangsamung des Aktivierungsprozesses; Terlau et al. 1996) und  $[Ca^{2+}]_i$ . (Blockade des Stromes; Schönherr et al. 2000, 2002).

Der erstmalige Nachweis eines EAG-Stromes und entsprechende m-RNA in menschlichen Zellen erfolgte durch Meyer und Heinemann (1998). Durch elektrophysiolo-

gische und molekularbiologische Untersuchungen konnte dort gezeigt werden, dass ein **hEAG-Kanal** in menschlichen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) exprimiert wird.

Bisher ist bekannt, dass beide **EAG-Kanäle** (EAG1, EAG2) im Gehirn exprimiert werden (Ludwig et al. 1994, Saganich et al. 1999, Wulfsen et al. 2000), es wurden aber noch keine nativen EAG-Ströme in normalen Hirnzellen gemessen. Native EAG-Ströme wurden bisher in stark proliferierenden Zellen, z.B. in embryonalem Muskelgewebe (Myoblasten; Bijlenga et al. 1998) und Tumorzelllinien (z.B. in Neuroblastom-Zellen; Meyer und Heinemann 1998) gefunden. Die Untersucher stellten weiterhin fest, dass in Myoblasten und in Neuroblastom-Zellen die Expression der EAG-Kanäle sehr stark von der jeweiligen Phase des Zellzyklus abhängt.

Der Kanal **hERG1** ist für die Repolarisation der Herzmuskelzellen verantwortlich, Mutationen des hERG1-Gens verursachen eine Form des Long-QT-Syndroms (Kardioarrhythmien) (Curran et al. 1995, Ganetsky 1999). Er spielt außerdem eine wichtige Rolle für die Steuerung der Prolaktinsekretion (Bauer et al. 2003). Die physiologische Bedeutung des neuronalen hERG1-Kanal ist noch nicht geklärt. Der Kanal konnte in verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen werden, es wird ein proliferativer Vorteil bei hERG1-Expression vermutet (Bianchi et al. 1998, Arcangeli 1999). Der hERG1-Kanal nimmt eine gesonderte Stellung innerhalb der eag-Familie ein. So gehört er zwar strukturell zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv), besitzt aber Eigenschaften eines einwärts gerichteten Gleichrichters (*inward rectifying*) (Trudeau et al. 1995, Smith et al. 1996).

Auch die bisher bekannten ERG-Kanäle 1-3 konnten im Gehirn nachgewiesen werden (ERG1-3: Ganetzky und Titus 2000, Saganich et al. 2001, Hirdes et al. 2005). Ihre Funktion ist unklar. In Astrozyten ist die Expression von hERG1 bekannt. Der Kanal soll neben den Kir-Kanälen für die Kaliumhomöostase im ZNS verantwortlich sein (Emmi et al. 2000).

### 2.2.3 Bedeutung der spannungsabhängigen $K^+$ -Kanäle für zellbiologische Prozesse

Die Vielfalt der spannungsabhängigen Kaliumkanäle gewährleistet je nach Gewebetyp die verschiedensten Funktionen. Ihre Aktivierung in *nicht-erregbaren* Zellen dient vorwiegend der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und Aufrechterhaltung der  $K^+$ -

Homöostase. Sie sind in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden eingebaut, so z.B. in der Aktivierungskaskade von T-Lymphozyten (Kv1.3: Helms et al. 1997).

In *erregbaren Zellen* sind sie für die Kontrolle der Erregbarkeit der Zellen durch Repolarisation der Membran und Frequenzmodulation von Aktionspotentialen verantwortlich. Im ZNS sind  $K^+$ -Kanäle in großer Dichte und Vielfalt vorhanden und sichern so die normalen Erregungsabläufe (Coleman et al. 1999).

Desweiteren wurde eine Rolle von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bei der Regulation der Zellproliferation (Lepple-Wienhues et al. 1996, Knutson et al. 1997), bei der Volumenregulation (Deutsch und Chen 1993) und beim programmierten Zelltod (Apoptose; Yu et al. 1997) beschrieben. Daneben sind Kaliumkanäle (Kir, Kv) bei der Wachstumsregulierung der Glia beteiligt (Sontheimer 1994). Beim Aktivierungsprozess der Mikroglia spielen Kv-Kanäle, darunter v.a. Kv1.3 und Kv1.5, eine wichtige Rolle (Schlichter et al. 1996, Jou et al. 1998, Kotecha und Schlichter 1999).

Es wird aber auch eine Relevanz der Kaliumkanäle hinsichtlich der Differenzierung von Zellen (MacFarlane et al. 2000b) oder der Transformation von nicht-neoplastischen zu neoplastischen Zellen gesehen (Wonderlin und Strobl 1996, Arcangeli et al. 1998, Bianchi et al. 1998, Cherubini et al. 2000).

### 2.2.3.1 Proliferation

Die Beteiligung der Kaliumkanäle bei der Proliferation ist für ein breites Spektrum an Zellarten bekannt (Lee et al. 1993, Dubois und Rouzaire-Dubois 1993, Wonderlin und Strobl 1996). Folgende Befunde legen eine wesentliche Rolle von spannungssensitiven Kaliumkanälen bei der Zellzyklus-Progression (G1-Phase) nahe: **1.)**  $K^+$ -Kanalblocker inhibieren die Proliferation (z.B.: Chiu und Wilson 1989, Allen et al. 1997, Attali et al. 1997, Rouzaire-Dubois und Dubois 1998, Rouzaire-Dubois et al. 2000) **2.)** es kommt zu Veränderungen der Kaliumleitfähigkeiten während des Zellzyklus und nach Einwirkung von Mitogenen -sie erhöhen die  $K^+$ -Kanalaktivität oder -expression (Dubois und Rouzaire-Dubois 1993, Nilius und Droogmans 1994, Wonderlin und Strobl 1996) **3.)**  $K^+$ -Kanalöffner stimulieren die Zellproliferation (z.B. Sanders et al. 1996).

Der genaue Mechanismus der Beteiligung der  $K^+$ -Kanäle im Ablauf der Proliferation, und welche Kanaltypen die bedeutendste Rolle dabei spielen, ist derzeit noch ungeklärt, aber es existieren folgende Hypothesen:

**I.)** Einerseits sollen über Veränderungen der Kaliumleitfähigkeit die durch Nährstoffaufnahme bedingten Zellvolumenschwankungen ausgeglichen werden (**Volumenregulationshypothese**). Die Regulation des Zellvolumens ist eine wichtige Zellfunktion für die Proliferation und Migration von Zellen. Die Aufnahme von Nährstoffen in die Zelle bewirkt einen Volumenanstieg bei Proliferationsvorgängen. Kaliumkanalaktivierung soll im Gegenzug einen *regulatory volume decrease* (RVD, Volumenabfall) hervorrufen und so das Zellvolumen stabilisieren und Mitose ermöglichen. Verschiedene Kanäle sind dabei involviert (Lang et al. 1998), bei den Kv-Kanälen scheinen besonders die Kanäle Kv1.3 (Deutsch et al. 1993) und Kv1.5 (Felipe et al. 1993) eine entscheidende Rolle zu spielen. Rouzaire-Dubois und Dubois (1998) machten bei der C6-Rattengliomzellen die Beobachtung, dass sich Proliferationsrate und Zellvolumen zueinander gegenläufig verhielten (eine sinkende Gliomzellproliferation ist mit steigendem Zellvolumen verbunden). Breitspektrumkanalblocker (TEA,  $\text{Cs}^{2+}$ ) oder hypertones Medium führten zur Verlangsamung der Proliferation. Das Anschwellen der Zellen vermindert die Konzentration an zell-regulierenden Proteinen und / oder bewirkt durch Umordnung des Zytoskeletts Interferenzen mit verschiedenen Zellfunktionen, was die reduzierte Proliferation erklären könnte (Rouzaire-Dubois und Dubois 1998, Rouzaire-Dubois et al. 2000).

**II.)** Die **Membranpotentialhypothese (Hyperpolarisationstheorie)** besagt, dass Kaliumkanäle für Membranpotentialbedingungen zuständig sind, die für proliferative Aktivitäten essentiell sind. Die Überwindung des Start-Punktes in der G1-Phase der Mitose wird von einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration getriggert. (Whitaker und Patel 1990). Eine Erniedrigung des Ruhemembranpotentials (Hyperpolarisation durch aktivierte  $\text{K}^{+}$ -Kanäle) fördert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch einen elektrochemischen Gradienten über die hyperpolarisierte Zellmembran und steigert so die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Nilius und Droogmans 1994). Ein hyperpolarisiertes Membranpotential ist ferner nötig zur Bildung von IP3 (Inositoltriphosphat) und nachfolgender intrazellulärer Kalziumfreisetzung (Whitfield et al. 1995). Die Hyperpolarisationstheorie ergab sich aus der Beobachtung, dass die mitogene Stimulation durch Depolarisation mittels hoher Kaliumkonzentration außerhalb der Zelle gegengesteuert werden kann (Canady et al. 1990, Lee et al. 1993). Ähnliche Beobachtungen wurden in einer Studie an Kolontumorzellen gemacht, hier inhibierten  $\text{K}^{+}$ -Kanalkblocker den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die Proliferation.

feration der Tumorzellen. Dabei spielten insbesondere die Kv-Kanäle für die Proliferation der Zellen eine wesentliche Rolle (Yao und Kwan 1999).

Weiterhin hat das Ruhemembranpotential Einfluss auf transmembranäre Transportvorgänge (neben Kalzium auch Nährstoffe). Durch Veränderungen der Kaliumleitfähigkeit der Membran wird das Ruhemembranpotential reguliert, dadurch werden Transportvorgänge durch die Membran beeinflusst, z.B. von Nährstoffen, welche für die Proliferation zuständig sind (Nilius und Droogmans 1994, Wonderlin und Strobl 1996, Rouzaire-Dubois und Dubois 1998, Rouzaire-Dubois et al. 2000).

### 2.2.3.2 Differenzierung

Die Differenzierung von unreifen Zellen in Zelltypen des adulten Organismus geht oft mit Veränderungen im Ionenkanalmuster einher (Ishiuchi et al. 1998, MacFarlane et al. 2000a). Es ist bereits bekannt, dass bei einigen Differenzierungsprozessen einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Kir) herauf und auswärts gleichrichtende Kaliumkanäle (spannungsabhängige Kaliumkanäle, Kv) herunter reguliert werden (Sobko et al. 1998, MacFarlane et al. 2000a). Dies konnte bei transformierten und nicht transformierten Zellen beobachtet werden: so zum Beispiel bei Untersuchungen an Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, glialen Retinazellen und Schwannzellen (Konishi 1989, Attali et al. 1997, Ma et al. 1998, Pappas und Ritchie 1998, Arcangeli et al. 1999, MacFarlane et al. 2000a). Während ruhende differenzierte Astrozyten besonders durch Kir-Ströme charakterisiert sind (Bordey und Sontheimer 1997, Li et al. 2001), zeichnen sich reaktive, proliferierende Astrozyten durch prominente verzögernd-gleichrichtende Kaliumströme ( $K_{DR}$ : z.B. Kv) und reduzierte Kir-Ströme aus (Koller et al. 1998, MacFarlane und Sontheimer 1997, Perillan et al. 1999, MacFarlane et al. 2000a, Li et al. 2001).

Maligne Zellen wurden meist *in vitro* unter differenzierungsfördernden Bedingungen untersucht. So konnte beim Differenzierungsprozess einer Leukämiezelllinie ein starker Rückgang der Kv1.3-mRNA und Anstieg der IRK-mRNA (Kir2-mRNA) festgestellt werden (DeCoursey et al. 1996).

Allerdings lässt sich ein definiertes Ionenkanalmuster für den proliferativen oder den differenzierten bzw. ruhenden Zustand von Zellen nicht herausstellen. Es gibt unterschiedliche Ionenkanalverteilungen in Abhängigkeit von Gewebetyp und Entwicklungsstadium. Dennoch kann der elektrophysiologische Phänotyp von Zellen Hinweise auf

Richtung und Intensität einsetzender Differenzierungsprozesse geben (Ishiuchi et al. 1998).

### 2.2.3.3 *Shaker*-Kanäle

Für die Kanäle Kv1.3 und Kv1.5 wurden je nach Differenzierungs- und Proliferationsstatus der Zelle unterschiedliche Expressionen beschrieben (Kotecha und Schlichter 1999). Dieses Verhalten ist Zellart-abhängig, was Untersuchungen an Lymphozyten, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen zeigten (Kotecha und Schlichter 1999, MacFarlane und Sontheimer 2000a, Vicente et al. 2005).

Als Kardinalbeispiel für den Zusammenhang zwischen Kaliumkanalaktivität und Proliferation wird meist das Ionenkanalmuster in T-Lymphozyten angeführt (Wonderlin und Strobl 1996). Kv1.3-Homomultimere und calciumaktivierte Kaliumkanäle sind bei diesen Zellen wahrscheinlich für die proliferationsassoziierte Hyperpolarisation verantwortlich und regulieren die Überführung der ruhenden Zellen in den aktiven Zustand (Helms et al. 1997, Khanna et al. 1999, Jensen et al. 1999, Levite et al. 2000). So konnte beim Aktivierungsprozess (Überführung der ruhenden Zellen in den aktiven Zustand) von Mikroglia eine essentielle Rolle der Kv-Kanäle beobachtet werden (Schlichter et al. 1996, Jou et al. 1998, Kotecha und Schlichter 1999).

Auch in Astrozyten wird der Bezug der Kaliumkanäle zur Proliferation der Zellen bestätigt (Konishi et al. 1989, Yager et al. 2001). Während ruhende differenzierte Astrozyten besonders durch Kir-Ströme charakterisiert sind (Bordey et al. 1997, Li et al. 2001), zeichnen sich reaktive, proliferierende Astrozyten durch prominente verzögernd-gleichrichtende Kaliumströme ( $K_{DR}$ ) und reduzierte Kir-Ströme aus (Koller et al. 1998, MacFarlane et al. 1997, Perillan et al. 1999, MacFarlane et al. 2000a, Li et al. 2001). Durch Kaliumkanalblocker konnte die gliale Proliferation (Schwann Zellen) gehemmt werden. Einen Zusammenhang von  $K^+$ -Kanälen und Proliferation könnte durch die Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials (RMP), die während der Proliferation von Schwann-Zellen auftritt, erklärt werden (Chiu und Wilson 1989). Die auswärts-gleichrichtenden ( $K_{DR}$ ) wurden ebenso in Oligodendrozyten als wichtige, in der Proliferation dieser Zellen beteiligte Kanäle nachgewiesen. Durch dieses Wissen war es möglich, die Proliferation der Zellen zu beeinflussen (Gallo et al. 1996, Knutson et al. 1997).

Die Expression von Kv1.3 ist in aktivierten bzw. proliferierenden Zellen besonders hoch (Nörenberger et al. 1992, 1993, Kotecha und Schlichter 1999, Chittajallu et al.

2002). Der durch Phosphorylierung aktivierte Kanal Kv1.5 hingegen wurde als ein für differenzierte Gliazellen typischer Kanal beschrieben (Roy et al. 1996, Schmidt et al. 1999, MacFarlane et al. 2000b). Kotecha und Schlichter (1999) untersuchten die Veränderung der Kanalexpression in der Zellkultur und beobachteten einen *switch* von Kv1.5 in nichtproliferierenden (differenzierten) Mikrogliazellen zu Kv1.3 in proliferierenden (weniger differenzierten) Gliazellen. Vergleichbares beschreiben Vicente et al. (2005) in Knochenmarksmakrophagen. Dort induziert Zellproliferation und -aktivierung Kv1.3-generierte Ströme.

Diese komplementäre Rolle der Kv-Kanäle für Proliferation und Differenzierung konnte in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden. So beschrieben MacFarlane und Sontheimer (2000b) Kv1.5 als einen für die Proliferation essentiellen Kanal. Durch Blockade der Expression des Kanals wurde eine Wachstumshemmung in Astrozyten erzielt. In der Studie von Jou et al. (1998) wurde mittels Immunhistochemie eine relativ starke Expression von Kv1.5 an aktivierten Mikrogliazellen nachgewiesen und eine eher schwache Expression an ruhenden Zellen beschrieben (Kv1.3 zeigte in beiden Fällen nur eine schwache Immunoreaktivität). In Oligodendrozytenvorläuferzellen wurde der Übergang von Zellen im Ruhestadium zu Zellen in der G1-Phase durch einen selektiven Anstieg beider Kanäle Kv1.3 und Kv1.5 Proteinexpression begleitet (Chittajallu et al. 2002). Durch einen spezifischen Block von Kv1.3 oder Kv1.5 konnte ein G1-Stillstand hervorgerufen werden. Die Reduzierung der Kv1.5-Proteinexpression hingegen mittels Antisense-Oligonukleotiden hatte keinen Effekt auf die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen (Attali et al. 1997, Chittajallu et al. 2002).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass beide Kanäle eine wesentliche Rolle in Gliazellen spielen. Die gleiche Kanalart kann wahrscheinlich verschiedene spezifische Funktionen je nach Entwicklungsstatus der Zelle und Zellart besitzen.

### **2.2.4 Onkogenes Potential**

Kaliumkanäle stehen in Verbindung mit der Transformation von normalen, nicht-neoplastischen in neoplastische Zellen. Bei der Suche nach Onkogenen wird neben Komponenten intrazellulärer Signalkaskaden die Rolle des Expressionsmusters spezifischer Ionenkanäle diskutiert. In einigen Tumoren trägt die Expression bestimmter Kanäle zur verstärkten und ungehemmten Proliferation bei. Es wird angenommen, dass eine Kaliumkanalüberexpression ein Merkmal der Transformation von normalen Zellen in neo-



plastische Zellen darstellen kann (Wonderlin und Strobl 1996, Arcangeli et al. 1998, Bianchi et al. 1998, Cherubini et al. 2000). Von großem Interesse sind die  $K^+$ -Kanäle der *ether-à-go-go*-Familie, da ihnen ein onkogenes Potential zugeschrieben wird (Pardo et al. 1999). Sie wurden in Gliomen bisher nicht untersucht.

### 2.2.4.1 Bedeutung der eag-Kanäle für die Tumorgenese

Die spannungsabhängigen Kanäle der *ether-à-go-go* (eag)-Familie (z.B. EAG1, ERG1) konnten in vielen verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen werden und stehen im Zusammenhang mit Tumorwachstum (Neuroblastom-Zellen: Arcangeli et al. 1997, Prolaktinom: Bauer et al. 2003, Endometriumcarcinom: Cherubini et al. 2000, humane Neuroblastom-Zellen: Meyer und Heinemann 1998, humane Melanom-Zellen: Meyer et al. 1999, verschiedene Tumorzellen: Pardo et al. 1999, Wang et al. 2002, Neoplastische Hämatopoese-Zellen: Smith et al. 2002, Magenkarzinomzellen: Shao et al. 2005).

Von besonderer Bedeutung waren die Befunde von Pardo et al. (1999), die zeigten, dass - außerhalb des Gehirns - eag-Kanäle in verschiedenen Tumorzellen vorkommen, nicht jedoch in dem jeweiligen gesunden Herkunftsgewebe. Sie besitzen transformierende Eigenschaften: in SCID-Mäusen verursachen sie *in vivo* eine Tumorprogression (Pardo et al. 1999). Die Verwendung von hERG-Antikörpern inhibiert die Proliferation von Magenkarzinomzellen und induziert Apoptose (Shao et al. 2005).

#### 2.2.4.1.1 hEAG1

**hEAG1** ist hinsichtlich der Expression strikt an den Zellzyklus gekoppelt (Meyer und Heinemann 1998). Dies bedeutet, dass hEAG1 für proliferierende Zellen wichtig ist und nährt die Vermutung, dass eine gezielte Beeinflussung von hEAG (ausschließlich oder im Zusammenspiel mit anderen Kaliumkanälen) perspektivisch therapeutische Relevanz bei Tumoren haben könnte (vgl. Conti et al. 2004). Diese Hypothese ist deshalb realistisch, weil hEAG bisher nicht in ausdifferenzierten Zellen (außerhalb des Gehirns) entdeckt wurde und eine Kanalmodulation diese Zellen unberührt ließe.

### 2.2.4.1.2 hERG1

**hERG1** wird auch in normalen Zellen exprimiert, dort allerdings nur in frühen Entwicklungsstadien, während er mit fortschreitender Zellreifung verloren geht. In Tumoren bleibt seine Expression erhalten (Bianchi et al. 1998). Eine hERG-Überexpression wird als Wachstumsvorteil gewertet (Bianchi et al. 1998), ist aber nicht tumorspezifisch (Bianchi et al. 1998, Pardo et al. 1999). Als weiteren Hinweis auf die Rolle des Kanals bei Tumoren wird seine Bedeutung bei der Depolarisierung der Zellmembran bei Tumorzellen diskutiert. Dies gilt insbesondere für den Kanal hERG1 mit seinen Eigenschaften eines einwärts gerichteten Gleichrichters (Bianchi et al. 1998).

Eine detaillierte Vorstellung über die Funktionsweise der eag-Kanäle bei zellulären Prozessen wie Proliferation und Differenzierung gibt es derzeit noch nicht.

### 2.2.5 Kaliumkanäle in Gliomen

Bei Untersuchungen an menschlichen Gliomzellen wurden  $K^+$ -Kanäle bzw. -ströme verschiedenster Art festgestellt: spannungssensitive  $K^+$ -Kanäle ( $K_v$ ), Kanäle mit einwärts-gerichteten  $K^+$ -Strom ( $K_{ir}$ ) oder calciumabhängige  $K^+$ -Kanäle ( $K_{Ca2+}$ ) (Brismar und Collins 1989a, 1989b, 1989c, Pallota 1987, Brismar 1995, Ransom 2001). Die Kanäle wurden in situ und in vitro nachgewiesen (Brismar und Collins 1989c, Patt et al. 1996, Labrakakis et al. 1997, Bordey und Sontheimer 1998)

Die ersten Untersuchungen der Rolle von  $K^+$ -Kanälen für die Proliferation von Gliomen wurden an einer menschlichen Astrozytomzelllinie durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass  $K^+$ -Kanalblocker effektiv das Wachstum der Hirntumorzellen inhibierten (Lee et al. 1993). Chin et al. (1997) wiesen in Gliomzelllinien einen  $K_{Ca2+}$  und einen auswärts gleichrichtenden Kaliumkanal ( $K_{DR}$ ) nach. Nur Substanzen, die den auswärts gleichrichtenden Kanal hemmen, konnten das Wachstum der Zelllinien hemmen und Apoptose induzieren.

Eine zentrale Rolle spielt die Studie von Bordey und Sontheimer (1998), in der die elektrophysiologischen Eigenschaften von Tumorzellen aus sechs niedriggradigen Astrozytomen und humanen nicht-neoplastischen Astrozyten beschrieben werden. Das Ionenkanalprofil der Tumorzellen und Astrozyten war unterschiedlich. Bei Tumorzellen

schiene ausnahmslos  $K_{DR}$  exprimiert zu sein. So fehlten Kir in diesen Zellen, während sie bei normalen Astrozyten durchweg nachweisbar waren. Sie können als Marker für differenzierte, nicht-proliferative Astrozyten gelten (Bordey und Sontheimer 1997). Ebenso beschrieben Akhtar et al. (1999) deutliche Unterschiede in der Kanalexpression zwischen nicht-transformierten und transformierten Glia-/Gliomzellen. Es fanden sich Änderungen des Ruhemembranpotentials (Brimar 1995).

Die Unterschiede im Ionenkanalprofil decken sich mit der Arbeit von Pancrazio et al. (1999), die in NG108-15-Zellen (Hybridzellen: Neuroblastom x Gliom) eine signifikant niedrigere Dichte von Kir in proliferierenden und höhere Dichten in neuronähnlichen differenzierten Zellen fanden.

Zusammenfassend scheint das Vorhandensein einer hohen Dichte an  $K_{DR}$  zusammen mit dem Fehlen von Kir als für Gliomzellen charakteristisch. Aus den obigen Daten ergeben sich hinsichtlich der Elektrophysiologie Parallelen zwischen unreifen Gliazellen und Gliomzellen. Es war ein hoher Anteil von spannungssensitiven Kanälen in Gliomen auffällig. Der vorherrschende elektrophysiologische Phänotyp reiferer Gliomzellen ähnelte überraschenderweise stark dem von Neuronen (Patt et al. 1996, Labrakis et al. 1997, Bordey und Sontheimer 1998). Welche Funktion diese Kanäle im Einzelnen haben, ist im Detail noch nicht geklärt. Neben den oben genannten Aspekten wird beispielsweise eine Rolle in der Entstehung von Tumorepilepsie diskutiert (Patt et al. 1996, Patt et al. 2000).

Die elektrophysiologischen Hinweise auf die Bedeutung von Kaliumkanälen in Gliomen sind zahlreich, wohingegen molekulare Befunde für die Kanalisformen fehlen. Inwieweit Unterschiede zwischen den jeweiligen Tumorentitäten in der Expression von diesen Kanalisformen bestehen, ist unklar. Mögliche Unterschiede können zu einer genaueren Charakterisierung von Gliomen beitragen und perspektivisch für ein therapeutisches Target von Bedeutung sein. In der vorliegenden Arbeit wird diesen Aspekten nachgegangen.

### **3 ZIELE DER ARBEIT**

Im Hinblick auf die Befunde, dass spannungsabhängige Kaliumkanäle eine funktionelle Rolle bei der Zellproliferation und –differenzierung u.a. auch bei Gliazellen spielen, lässt sich die Hypothese über eine ähnliche Rolle in glialen Tumoren aufstellen.

- Ausgehend von elektrophysiologischen Vorbefunden sollen in der vorliegenden Arbeit anhand molekularbiologischer Methoden spannungsabhängige Kaliumkanäle auf mRNA-Ebene in operativ gewonnenen Gewebeproben von humanen Gliomen unterschiedlicher biologischer Wertigkeit und Histologie nachgewiesen werden.
- Mittels kanalspezifischer Oligonukleotidprimer soll eine Charakterisierung der Gliome hinsichtlich der nachweisbaren Kanalisformen vorgenommen werden.
- Dabei soll besonders nach Unterschieden bezüglich der nachweisbaren Kaliumkanalisformen zwischen Gliomen unterschiedlicher Malignität und Histologie gesucht werden.
- Die Resultate der Arbeit sollen mit den vorhandenen Daten der Literatur verglichen werden, um der Fragestellung nach einer möglichen funktionellen Rolle von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in Gliomen nachzugehen.

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 Material**

Die untersuchten Gewebeproben und Zelllinien werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben. Es werden die klinisch-pathologischen Daten der Gewebeproben sowie die Herkunft und Bedeutung der Zelllinien aufgeführt. Weiterhin werden die Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen, Primer und Geräte mit Angaben zur Herstellerfirma und Herkunftsland tabellarisch aufgeführt.

#### **4.1.1 Gewebeproben**

Die untersuchten Gewebeproben stammten von Patienten, die in der Klinik für Neurochirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, des Helios-Klinikum Erfurt und des Krankenhauses Bergmannstrost in Halle operiert wurden. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Friedrich Schiller Universität Jena geprüft und freigegeben (No. 0198-02/99).

Das intraoperativ gewonnene Material wurde spätestens 15 min nach der Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA Isolierung bei  $-75^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anhand HE-gefärbter Gefrierschnitte, die für die Proben repräsentativ waren, wurde die histologische Zusammensetzung der Proben gemäß der WHO-Klassifikation von Hirntumoren (Kleihues und Cavane 2000) durch Prof. Dr. Patt beurteilt. Nur Tumorproben mit einem Mindestanteil von 80% an neoplastischen Zellen wurden für die Untersuchung verwendet. Die als Referenzgewebe verwendete tumorfreie Gewebeprobe (Biopsie; tumorfreies Randgebiet aus einer Gliomoperation, histologisch bestätigt) wies sowohl zerebralen Kortex als auch weisse Hirnsubstanz auf.

Die Tumorproben entstammten den folgenden Entitäten: drei pilozytische Astrozytome (WHO-Grad I), vier diffuse Astrozytome (WHO-Grad II, eine Probe dieser Gruppe stellte ein Rezidiv eines Astrozytoms dar), fünf oligodendrogliale Tumore (ein Oligoastrozytom WHO-Grad II, vier Oligoastrozytome WHO-Grad III) und fünf Glioblastome (WHO-Grad IV).

Die klinischen und pathologischen Daten der Gewebeproben sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Tumorproben stammten von dreizehn männlichen und vier weiblichen Patienten. Das mittlere Patientenalter betrug zum Operationszeitpunkt  $40,4 \pm 22$  Jahre.

**Tabelle 4.1.: Klinisch-pathologische Daten der untersuchten Gewebeproben**

Probe	Diagnose	Alter Patient (Jahre)	Geschlecht Patient
<b>1</b>	pA I	10	M
<b>2</b>	pA I	11	W
<b>3</b>	pA I	30	M
<b>4</b>	A II	38	M
<b>5</b>	A II	31	M
<b>6</b>	A II (Tumorrezidiv)	21	W
<b>7</b>	A II	37	M
<b>8</b>	OA II	59	M
<b>9</b>	OA III	31	M
<b>10</b>	OA III	10	M
<b>11</b>	OA III	45	W
<b>12</b>	OA III	59	M
<b>13</b>	GB IV	78	W
<b>14</b>	GB IV	73	M
<b>15</b>	GB IV	39	M
<b>16</b>	GB IV	74	M
<b>17</b>	GB IV	39	M
<b>GG</b>	Biopsiegewebe; nicht-neoplastisch	65	M

pA: pilozytisches Astrozytom; A: diffuses Astrozytom; OA: Oligoastrozytom; GB: Glioblastom; I-IV: WHO-Malignitätsgrade nach Kleihues und Cavenee, 2000; GG: gesundes Gehirngewebe (Referenzgewebe); W: weiblich; M: männlich

Das durch Biopsie gewonnene und als „gesundes“ bzw. tumorfreies Gehirngewebe diagnostizierte Material wurde als Positivkontrolle für die Expression der Kanalisiform

hEAG1 und zum Vergleich der Expression zwischen neoplastischem und tumorfreiem Gewebe eingesetzt.

#### 4.1.2 Zelllinien

Als Positivkontrollen für die Expression der untersuchten Kaliumkanäle hERG1, Kv1.3 und Kv1.5 wurden Zelllinien verwendet, für die eine Expression der Kanäle nachgewiesen ist. Die Zuordnung der Positivkontrollen zum spezifischen Kanal, die Bezeichnung und Herkunft der Zelllinien sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

**Tabelle 4.2 : Zelllinien als Positivkontrollen für die untersuchten Kanäle**

Probe	Bezeichnung	Herkunft	Bekannte Expression des Kanals
<b>N2</b>	<i>SH-SY5Y</i> humane Neuroblastomzelllinie	DSMZ, Braunschweig, Deutschland	<b>hERG1</b> (Arcangeli et al. 1998, Bianchi et al. 1998)
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney-Cell Line 293</i> menschliche embryonale Nierenzelllinie 293	CAMR, Großbritannien, freundlich überlassen vom Physiologischen Institut II der FSU Jena	<b>Kv1.5</b> (Uebele et al. 1996)
<b>JC</b>	<i>Jurkat-Cell Line</i> T-Lymphozyten-Zelllinie	DSMZ, Braunschweig, Deutschland, freundlich überlassen vom Institut für Molekulare Zellbiologie der FSU Jena	<b>Kv1.3</b> (Helms et al. 1997, Lewis und Cahalan 1995)

CAMR: *Centre for Applied Microbiology & Research*; DSMZ: deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Für den Kaliumkanal hEAG1 wurde das gesunde Gehirngewebe (siehe Tabelle 4.1) als Positivkontrolle genutzt (Occhiodoro et al. 1998, Ludwig et al. 2000, Saganich et al. 2001).

#### 4.1.3 Chemikalien (Tabelle 4.3)

Bezeichnung	Konzentration / Zusam-	Hersteller
-------------	------------------------	------------

<b>mensetzung</b>		
Agar	<i>bacteriological grade</i>	ICN Biomedicals, Eschwege
Agarose		SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampicillin	50mg/ml	SERVA, Heidelberg
β- Mercaptoethanol	>98% rein	SIGMA, München
Borsäure	<i>kristallin reinst</i>	MERCK, Darmstadt
Chill-Out Wachs		MJ Research, Inc., Waltham, USA
CsCl (Cäsiumchlorid)	99,9% rein	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylformamid	<i>research grade</i>	SERVA, Heidelberg
pUC19 DNA/ <i>MspI</i> ( <i>HpaII</i> ) Marker	0,1µg/µl	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DTT (Dithiothreitol)	10mM	Promega, Mannheim
dATP	100pM	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dGTP	100pM	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dCTP	100pM	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dTTP	100pM	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	0,5M	SERVA, Heidelberg
Ethanol absolute	99,9% rein	J.T. BAKER, Philipsburg, USA
Ethidium-Bromid	5mg/ml	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Guanidiniumrhodanid	99%	MERCK, Darmstadt
H <sub>2</sub> O als Aqua ad iniectionem		Braun, Melsungen
Hefe-Extrakt	in Pulverform	ICN Biochemicals, Eschwege
IPTG	100mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	>99% rein	SERVA, Heidelberg
Gel-Ladepuffer	6x (0.09% Bromophenolblau, 0.09% Xylencyanol FF, 60% Glycerol, 60mM EDTA)	MBI Fermentas
MgCl <sub>2</sub> -hexahydrate (Magnesiumchloridhexahydrate)	>98% rein	SERVA, Heidelberg
Natriumazetat	>99% rein	SERVA, Heidelberg
NaCl (Natriumchlorid)	>99% rein	SERVA, Heidelberg
NaOH (Natriumhydroxid)	Plätzchen zur Analyse, >98% rein	MERCK, Darmstadt
Pepton	<i>tryptic</i>	SERVA, Heidelberg
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	20%	SERVA, Heidelberg
Tris	<i>ultra pure</i>	ICN Biomedicals, Eschwege
X-Gal	<i>ultra pure</i>	Gibco/ Invitrogen GmbH, Karlsruhe



#### 4.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. (1989) hergestellt.

- 5,7 molare Cäsiumchloridlösung zur Gradientenzentrifugation: in 50ml H<sub>2</sub>O bidest. wurden 95,97g CsCl eingewogen, anschließend 0,83ml 3 M Na-acetat (pH 6) zugegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 100ml aufgefüllt. Schließlich wurde die Lösung steril abfiltriert.
- 4 molarer Guanidiniumrhodanid-Homogenisationspuffer: in 150ml H<sub>2</sub>O wurden 94,53g Guanidiniumthiocyanat eingewogen. Anschließend wurden 1,67ml 3 M Na-acetat (pH 6) zugefügt und mit H<sub>2</sub>O auf 200ml aufgefüllt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde 1,67ml  $\beta$ -Mercaptoethanol zugeführt.
- TBE-Puffer: Der TBE-Puffer wurde als 10-fach konzentrierte Stocklösung hergestellt: In 950ml H<sub>2</sub>O wurden 54g TrisBase und 27,5g Borsäure eingewogen sowie 20ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) zugegeben. Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.
- SOC-Flüssigmedium: In 950ml H<sub>2</sub>O wurden 20g Pepton, 5g Hefe-Extrakt (*yeast extract*) und 0,5g NaCl eingewogen. Danach wurden 10ml einer 250mM KCl-Lösung zugegeben. Der pH wurde mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden 5ml 2 M MgCl<sub>2</sub> und 20ml 1 M Glucose zugefügt. Aliquots von je 50ml wurden bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert.
- LB Flüssigmedium: In 950ml H<sub>2</sub>O wurden 10g Pepton, 5g Hefe-Extrakt und 10g NaCl eingewogen. Durch Zugabe von 5 N NaOH wurde ein pH von 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt, autoklaviert und bis zum Gebrauch bei +4°C gelagert.
- LB Agar: Zur Herstellung von LB Agar wurde 1l LB Medium (s. dort) vor dem Autoklavieren mit 15g Agar versetzt.
- LB/IPTG/X-Gal Agar Platten: LB Agar wurde im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Pro 1l Agar wurden 1ml Ampicillin (50mg/ml) sowie 2ml IPTG (100mM) und 2ml X-Gal (2% in Dimethylformamid) zugegeben. Ca. 30ml Agar wurden in je eine Petrischale gegossen, bei Raumtemperatur zum Erstarren gebracht und bis zum Gebrauch bei +4°C unter Lichtschutz gelagert.

#### 4.1.5 Oligonukleotide (Primer)

Alle zur PCR-Reaktion bzw. Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) in Standard HPSF-Aufreinigung bezogen. Durch Lösen der Lyophilisate in einem vom Hersteller angegebenen Volumen bidestilliertem Wasser wurden Stocklösungen mit einer Konzentration von 100pmol/μl hergestellt. Daraus frisch angesetzte Aliquots mit einer Konzentration von 10pmol/μl dienten als Arbeitslösung. Die Primer und die aus ihnen hergestellten Aliquots wurden bei – 20°C gelagert. Die wichtigsten Daten der zur PCR verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

**Tabelle 4.4: Sequenzen der Oligonukleotidprimer (PCR-Experimente)**

Primerbezeichnung (Gen-Bank- Accession-Nummer)	Sequenz		Größe amplifiziertes Fragment (bp)
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>	
<b>GAPDH</b> (AJ005371)	5'-CGG GAA GCT TGT GAT CAA TGG-3'	5'-GGC AGT GAT GGC ATG GAC TG-3'	357
<b>Kv1.3</b> (M85217)	5'-GGT CAT CAA CAT CTC CGG CGT GCG CT-3'	5'-AGG GCC GCT CCT CCT CCC GC-3'	314
<b>Kv1.5</b> (M83254)	5'-GTC AAG GCC AAG AGC AAC G-3'	5'-CAA ATA CAT CCA TCT CAC AGC G-3'	346
<b>hEAG1</b> (AF078741)	5'-CAC GTT TCT GGA GAA TAT TGT TCG-3'	5'-TAT CAG TCA GCT CCC CAT ACA TA-3'	185
<b>hERG1</b> (AB044806)	5'-AGA TGC TGC GGG TGC GG-3'	5'-CGA AGG CAG CCC TTG GTG-3'	229

GAPDH: Glycerolaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase; Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen der Kaliumkanäle; A: Adenosin; C: Cytosin; G: Guanosin; T: Thymidin; bp: Basenpaare

Für die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde ein am 5'-Ende mit IRD800 markiertes Oligonukleotid mit folgender Sequenz verwendet:

IRD800-M13\_rev

CAG GAA ACA GCT ATG AC

**4.1.6 Kits und Enzyme (Tabelle 4.5)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Plasmid Miniprep Kit	Biometra, Göttingen
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Amersham Biosciences, Freiburg
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Bioscience, Freiburg
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Organge, CA, USA

**4.1.7 Geräte (Tabelle 4.6)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
DNA-Sequencer Long ReadIR 4200	LI-COR, Bad Homburg
Gelelektrophorese-Kammer Agargel Maxi	Biometra, Göttingen
Kameratubus H6-EL (GH10) 0,8x	Polaroid, Offenbach
Kamerafilter #15 Dunkelgelb	Polaroid, Offenbach
Polaroid DS-34 Gelkamera	Polaroid, Offenbach
Polaroid Type 667 film (ISO 3000)	Polaroid, Offenbach
Scanner OpticPro P12	Plustek, Norderstedt
Spektrophotometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Stromversorgungsgerät Consort Power Supply	Consort nv, Belgien
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus instruments
TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge Optima™ XL-100K	Beckmann Coulter, Krefeld
UV- Leuchttisch TFX 35 MC	Vilbert Lourmat, Marme la Vallée, Frankreich

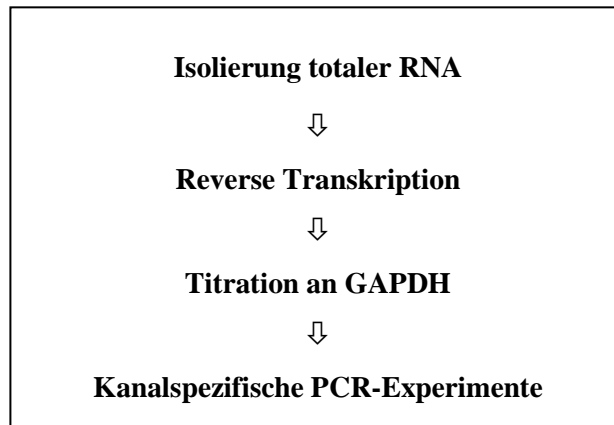
**4.1.8 Software und Internetdatenbanken (Tabelle 4.7)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Base ImageIR™ Version 3.0	LI-COR, Bad Homburg
ImageJ Version 1.22	Wayne Rasband
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
SPSS Version 10.0.7	SPSS Inc., Chicago, USA
UCSC	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>

**4.2 Methode**

Aus den zu untersuchenden Proben wurde totale RNA isoliert und anhand der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Mittels Titrationsexperimenten wurden die Konzentrationen der cDNA unter Verwendung von GAPDH-spezifischen Primerpaaren standardisiert (siehe Äquilibrierung). Um die Expression von Kaliumkanälen in dem Untersuchungsmaterial zu ermitteln, wurden PCR-Experimente mit kaliumkanalspezifischen

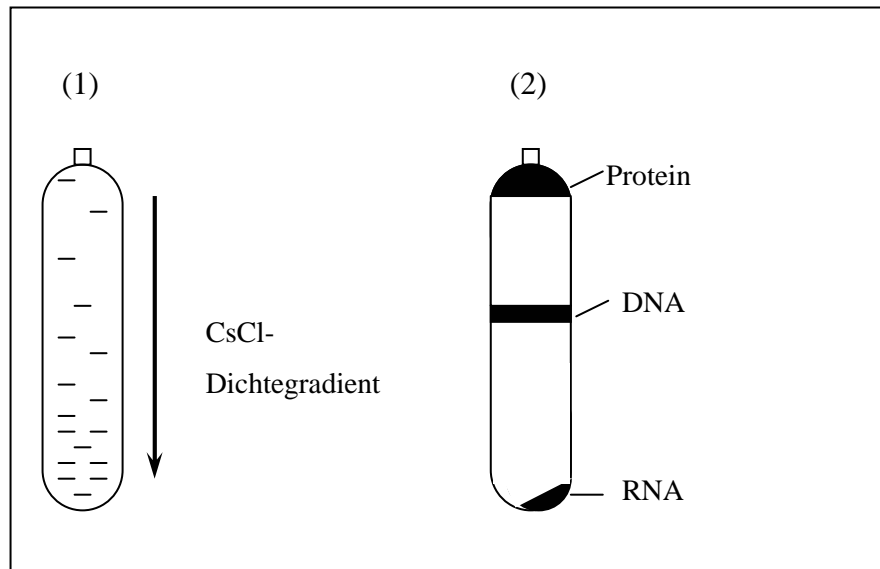
schen Primerpaaren durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden nach der Auftrennung und Detektion mittels Agarosegelelektrophorese densitometrisch ausgewertet. Der Versuchsablauf wird in Abbildung 4.1 veranschaulicht.



**Abbildung 4.1: Schema Versuchsablauf**

#### **4.2.1 Isolation totaler RNA**

Die RNA-Isolierung wurde mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation nach der Methode von MacDonald et. al (1987) und Jacobson (1987) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode nutzt einen durch Ultrazentrifugation erzeugten Cäsiumchloridgradienten in einer Lösung. Die Verteilung der einzelnen Zellbestandteile innerhalb dieser Lösung hängt von der jeweiligen Cäsiumchloridkonzentrationen ab. RNA reichert sich im Bereich der höchsten Konzentration an. Aufgrund der Zentrifugalkräfte formiert sich die RNA als Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens, während DNA und Proteine im Überstand zu finden sind. Hierdurch ist eine Auftrennung des Homogenisats in seine Bestandteile möglich (siehe Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2: Cäsiumchlorid-Dichtezentrifugation** (1) Darstellung des CsCl-Dichtegradienten, wie er durch Ultrazentrifugation entsteht. Pfeil: steigende CsCl-Konzentration (2) Trennung der Zellbestandteile (z.B. Protein, DNA und RNA) im Dichtegradienten und Verteilung aufgrund der Zentrifugalkräfte.

Das gefrorene Untersuchungsmaterial wurde in einem frisch autoklavierten Glashomogenisator unter Einsatz von 10ml 4molarem Guanidiniumrhodanid-Homogenisationspuffer homogenisiert und lysiert. Pro Probe wurde ein Beckman-Zentrifugentube (Modell SW 41) mit 4ml einer 5,7M Cäsiumchlorid-Lösung gefüllt. Anschließend wurde das Gewebelysat darüber geschichtet und das Zentrifugenröhrchen austariert. Bei Raumtemperatur wurden die Proben 16 Stunden mit 32.000 Upm ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das RNA-Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens wurde in 100µl 0,2% SDS gelöst und für 5 min im Thermomixer auf 65°C erhitzt. Die **RNA-Fällung** erfolgte unter Zusatz von 10µl (1/10 des Ausgangsvolumens) 3M Natriumazetat (pH 6) und 250µl (2,5-fachen des Ausgangsvolumens) 96%igem Ethanol. Über Nacht wurden die Proben bei -20°C gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 15min mit 13.000 Upm zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgenommen und die Pellets mittels 100µl 70%igem Ethanol gewa-

schen. Nach 3min Zentrifugation mit 13.000 Upm wurde der Überstand abgenommen, die Pellets für 10min luftgetrocknet und in je 50µl bidestilliertem Wasser gelöst. Die Proben wurden bei  $-75^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die **RNA-Konzentration** wurde in einer 1:100-Verdünnung spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt (GeneQuantII). Um die Reinheit der RNA zu überprüfen, wurde die Extinktion zusätzlich bei 280nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren Proteine. Der Quotient E260/280 der gemessenen Extinktionen lag zwischen 1,8 und 2,0. Somit wurde die Reinheit der RNA bestätigt.

Aus dem zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterial konnten unterschiedlich große Mengen an Gesamt-RNA gewonnen werden. Je nach Probe schwankten die ermittelten Konzentrationen zwischen 37 und 710ng/µl, entsprechend einer Gesamtmenge zwischen 7,4µg und 142µg an totaler RNA. Die Ausbeute an RNA korrelierte mit der Menge des zur Verfügung stehenden Frischmaterials.

#### **4.2.2 Reverse Transkription**

Mit Hilfe der Reversen Transkription wird von spezifischen RNA-Sequenzen mittels sogenannter RNA-abhängigen DNA-Polymerasen ein komplementärer cDNA-Strang (copyDNA) synthetisiert, der als Matrize einer anschließenden PCR zur Amplifikation genutzt werden kann. Somit ist es möglich, RNA-Sequenzen spezifisch zu vervielfältigen. Ein Vorteil liegt in der weniger anfälligen Struktur der cDNA.

Zur Durchführung der Reversen Transkription wurde das Reverse Transcription System (Promega, Tabelle 4.5) wie folgt verwendet.

Jeder 60µl-Reaktionsansatz enthielt: 0,5µl RNasin, 200pmol jedes Nukleotidtriphosphats (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1nm Oligo-(dT)<sub>15</sub> als Primer und 1,5µg totale RNA und Wasser.

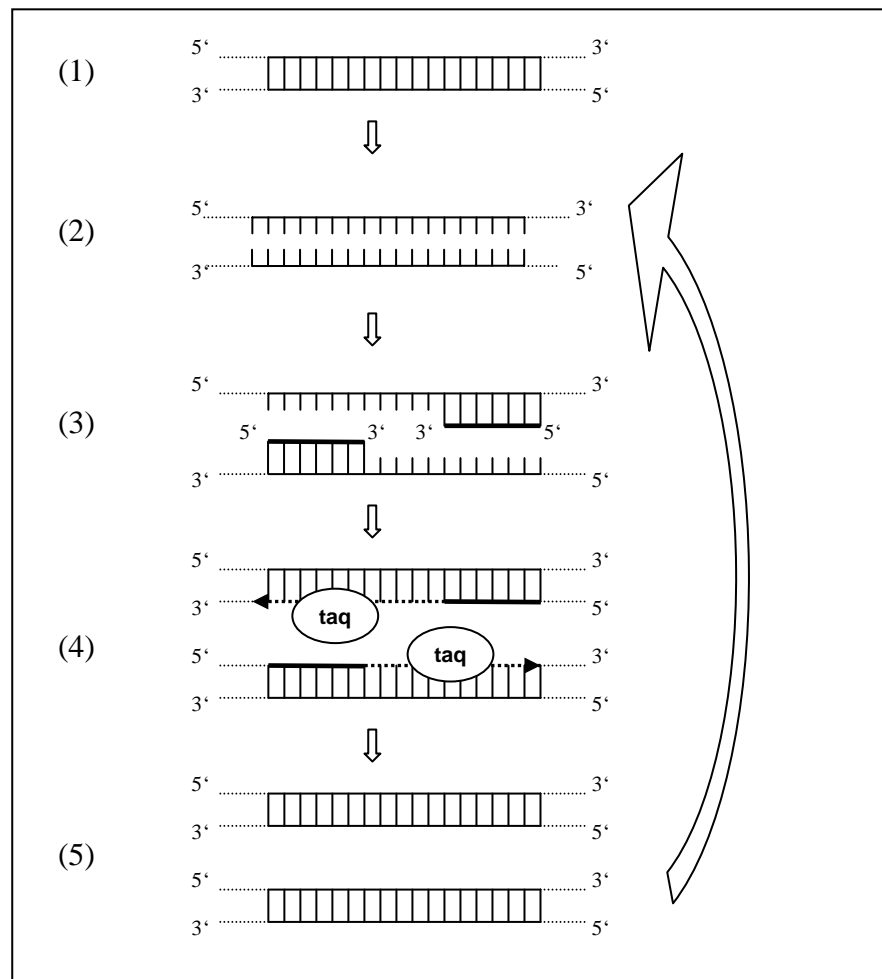
Der Reaktionsansatz wurde im Thermomixer für 3min auf  $80^{\circ}\text{C}$  erhitzt, es folgte eine Kühlung der Probe für 3min durch Lagerung auf Eis. Beide Vorgänge wurden jeweils drei Mal wiederholt. Im Anschluß wurden 12µl Reaktionspuffer (AMV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer, Promega) und 2µl 0,1M DTT dem Reaktionsgemisch zugeführt. Nach 3-minütiger Aufbewahrung der Proben bei Raumtemperatur erfolgte der

Start der Reversen Transkription durch Hinzufügen von 30 Units AMV Reverse Transkriptase (AMV, Promega) und Inkubation für 8min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Probe in dem auf 35°C vorgeheizten Thermoblock erwärmt. Innerhalb von 10min wurde die Temperatur in Schritten von jeweils 1°C auf 42°C erhöht und für weitere 50 min bei 42°C belassen. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf 95°C erhitzt und daraufhin sofort wieder auf Eis abgekühlt. Zum Schluss wurde die Fällung der cDNA nach dem gleichen Schema wie die RNA-Fällung durchgeführt (siehe oben).

Die Proben wurden bis zum weiteren Einsatz in den PCR-Experimenten bei –20°C gelagert.

#### **4.2.3 PCR-Experimente**

Die PCR (*Polymerase Chain Reaktion*), von Mullis et al. (1986) entwickelt, ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Zwei spezifische Oligonukleotid-Primer binden gegenläufig an die komplementären Basen der DNA-Stränge und dienen so als Startpunkt für die enzymatische Synthese der Matrizenstränge. Mittels zyklischer Wiederholung der Reaktionsschritte ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen in vitro zu vervielfältigen. Dieser Vorgang läuft exponentiell ab, somit besteht –in gewissen Grenzen- die Möglichkeit, aus der Menge des entstandenen Produkts auf die Ausgangsmenge zurückzuschließen. In Abb. 4.3. wird eine Übersicht über Prinzip und Ablauf der PCR gegeben.



**Abbildung 4.3: Prinzip der Polymerasekettenreaktion** (1) doppelsträngige DNA wird bei (2) 94°C zu einzelsträngiger DNA denaturiert, (3) es binden sich die spezifischen Primerpaare bei der jeweils gewählten Annealing-Temperatur. Im folgenden Schritt (4) synthetisiert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase (taq) den jeweils komplementären Strang bei 72°C. (5) Am Ende eines Zyklus liegen somit zwei Kopien der Ausgangs-DNA vor. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt.

#### 4.2.3.1 Äquilibration anhand eines GAPDH-Standards

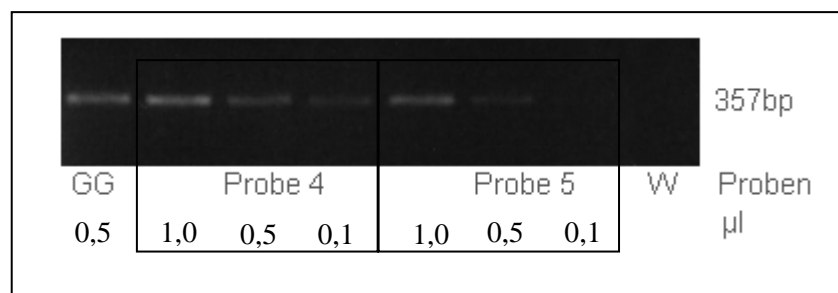
Um eine Semiquantifizierung der PCR-Produkte vornehmen zu können, musste sichergestellt werden, dass jeweils gleiche Mengen an cDNA für die PCR-Experimente eingesetzt wurde. Aus diesem Grund wurde eine Äquilibration der einzusetzenden cDNA-Volumina anhand eines GAPDH-Standards durchgeführt.

Für die Äquilibrations-Experimente wurden GAPDH-spezifische Primer nach den Vorgaben von Prof. Dr. Wölfl (Universität Heidelberg) eingesetzt (Sequenzen siehe Tabelle 4.4). Jeder Reaktionsansatz enthielt das entsprechende Volumen an cDNA der jeweiligen Probe, 5µl 10xPCR-Puffer, 30pmol des GAPDH-spezifischen Forward- und



Reverse-Primers, jeweils 100pmol jedes Desoxynukleotids (dGTP, dCTP, dTTP, dATP), 2,5U Taq-Polymerase sowie 4mmol MgCl<sub>2</sub>. Die Ansätze wurden mit bidestilliertem Wasser auf 50µl aufgefüllt. Mittels TRIO-Thermoblock wurden 25 Zyklen wie folgt durchgeführt: beginnend mit einer 40-sekündigen Denaturierung bei 94°C, anschließend einer 40-sekündigen Annealingphase bei 58°C und einer 22-sekündigen Elongationsphase bei 72°C. Am Ende jeder PCR wurde der Ansatz zur terminalen Elongation für 10min bei 72°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die PCR-Produkte getrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Der Intensitätsvergleich der resultierenden Banden erfolgte densitometrisch (siehe 4.2.6.1). Als Standard wurde eine Bande definiert, die dem aus 0,5µl gesundem Gehirngewebe resultierenden GAPDH-Signal entsprach. Die Äquilibrierung wurde durchgeführt, in dem mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Mengen cDNA der Tumore bzw. Zelllinien in Verdünnungen GAPDH-Experimenten unterzogen wurden. Dadurch wurden die verschiedenen Volumina ermittelt, mit denen bei den Tumoren bzw. Zelllinien eine dem GAPDH-Standard entsprechende Bande erzielt werden konnte. Je nach Probe lagen die so ermittelten Volumina, die anschließend für die kanalspezifischen PCR-Experimente eingesetzt wurden, zwischen 0,01µl und 2,0µl pro PCR-Reaktionsansatz.

Zur Verdeutlichung dieser Vorgehensweise sind in Abbildung 4.4 beispielhaft die Verdünnungsreihen zweier Tumorproben sowie die Bande des Standards (0,5µl cDNA gesundes Hirngewebe im PCR-Reaktionsansatz) und die Negativkontrolle (Wasser) dargestellt. In Abbildung 4.5 sind die Elektrophoresegele der so ermittelten Volumina für jede Tumorprobe dargestellt. Nach Durchführung der densitometrischen Auswertung lag der so ermittelte mittlere Grauwert der Bande von 0,5µl gesunden Gewebe bei 20 (±2,1) (näheres siehe Abschnitt 4.2.6.1).



**Abbildung 4.4: GAPDH-spezifische PCR an zwei Beispielen** GG: gesundes Gehirngewebe; W: Wasser; Probe 4: diffuses Astrozytom; Probe 5: diffuses Astrozytom (siehe Tabelle 4.1); Angabe der eingesetzten Volumina in µl; 357bp: Größe der Banden in Basenpaaren (bp)



**Abbildung 4.2: Elektrophoresegele der GAPDH-standardisierten Tumorproben** Alle Tumorbanden weisen im Verhältnis zur Bande des gesunden Gewebes (GG) gleichstarke Banden auf. GG: Gesundes (tumorfrees) Gehirngewebe; 1-17: Tumorproben 1-17; 357 bp: Größe der Banden in Basenpaaren

#### 4.2.3.2 Bestimmung der Primersequenzen

Zunächst musste die entsprechende **Genregion** der jeweiligen zu untersuchenden Kanäle ermittelt werden. Dabei wurden die Bezeichnung der Kanäle sowie die mRNA-Sequenzen der zugehörigen Gene mit Hilfe der online Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) abgeglichen. Für alle weiteren Analysen wurden die online Datenbank- und Softwaredienste der University of California, Santa Cruz (UCSC) genutzt. Die mRNA-Sequenzen wurden zuerst mit dem gesamten humanen Genom verglichen. Daraus ergaben sich Informationen, für welche Abschnitte es Homologien zu anderen Genen gibt. Weiterhin wurde nach bekannten Spleissformen der Gene in diesen Bereichen gesucht. Eine Region wurde gewählt, wenn sie (1) keine starken Homologien zu anderen Genen aufwies, (2) wenn sie mehrere Exons überspannte und (3) keine alternativen Spleisstellen enthielt.

Die Suche nach potentiellen Primerbindestellen beschränkte sich auf die zuvor ausgewählten Genregionen. Bei der Wahl der **Primersequenzen** wurde versucht, folgenden Kriterien zu erfüllen: (1) Die Annealing-Temperatur sollte zwischen 55°C

und 60°C liegen. (2) Die Primer sollten möglichst keine Palindrome enthalten, um Sekundärstrukturen zu vermeiden. (3) Das 5'-Ende eines Primers sollte mit einem G oder einem C enden (GC-clamp), um hier eine besonders starke Bindung an das Template zu erreichen. Primer, die für ein und dieselbe PCR-Reaktion vorgesehen waren, sollten ausserdem: (4) exonübergreifend sein, um die ausschliessliche Amplifikation von cDNA zu gewährleisten, (5) in ihrer Annealing-Temperatur um nicht mehr als 2°C auseinanderliegen, (6) keine komplementären 5'-Enden besitzen, um die Bildung von Primerdimeren während der PCR zu minimieren und (7) nicht beide auf eine andere Region des Genoms passen.

In Tabelle 4.4 sind die jeweiligen Primersequenzen, die Gendatenbanknummer und die Größe des amplifizierten Fragmentes aufgeführt.

#### 4.2.3.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Da die optimale Effizienz der ermittelten Primer bei unterschiedlichen Bedingungen liegen konnte, wurden verschiedene Versuchsreihen für jedes Primerpaar durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für das jeweilige Paar festlegen zu können.

Als Template dienten eine jeweils gleiche Menge an cDNA der Positivkontrollen der jeweiligen Kanalisform (siehe Abschnitt 4.1.2: gesundes Gehirngewebe für hEAG1, Lymphozytenzelllinie für Kv1.3, Nierenzelllinie für Kv1.5, Neuroblastomzelllinie für hERG1) und ein 1:10 verdünnter Ansatz dieser Proben. Im Reaktionsprotokoll wurden systematisch die Annealingtemperatur und Magnesiumchloridkonzentration variiert. Neben der vom Hersteller (MWG-Biotech AG, Ebersberg) angegebenen Annealingtemperatur wurden je Ansatz zusätzlich PCR-Experimente mit um 2°C höheren und 2°C niedrigeren Temperaturen durchgeführt. Weiterhin enthielten die Reaktionsansätze 1,5mmol, 2,5mmol oder 3,5mmol Magnesiumchlorid. Es erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Bewertung der resultierenden Banden hinsichtlich Intensität, Reinheit und Größe. Es kamen diejenigen Reaktionsbedingungen für die weiteren PCR-Experimente zur Anwendung, die folgende Kriterien erfüllten: (1) Es wurde ein Produkt der erwarteten Größe amplifiziert. (2) Nur eine klar abgrenzbare Bande wurde amplifiziert. (3) Die Bande konnte densitometrisch gemessen als signalintensivste Bande bewertet werden. In Tabelle 4.8 werden die so ermittelten Reaktionsbedingungen für das jeweilige Primerpaar aufgeführt.

**Tabelle 4.8: Versuchsbedingungen der kanalspezifischen PCRs**

<b>Primer</b>	<b>Größe amplifiziertes Fragment (bp)</b>	<b>Elongations-Zeit (s)*</b>	<b>[MgCl<sub>2</sub>] (mmol)</b>	<b>Annealing-Temperatur (°C)</b>
<b>Kv1.3</b>	314	21	1,5	67
<b>Kv1.5</b>	346	24	1,5	60
<b>heag</b>	185	15	2,5	61
<b>HERG1</b>	229	17	2,5	66

\*Elongationszeit nach Größe des zu amplifizierenden Fragments: 1000bp/min bei 72°C; Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen der Kaliumkanäle; [MgCl<sub>2</sub>]: Magnesiumchloridkonzentration im Reaktionsansatz; bp: Basenpaare

#### 4.2.3.4 Kanalspezifische PCR

Jeder Reaktionsansatz enthielt: 5µl 10xPCR-Puffer, 30pmol des kanalspezifischen Forward- und Reverse-Primers, jeweils 100pmol jedes Desoxynukleotids (dGTP, dCTP, dTTP, dATP), 2,5U Taq-Polymerase und je Primerpaar eine entsprechende Menge an MgCl<sub>2</sub> (siehe Tabelle 4.8.). Als Matrize wurden die in den Äquilibrierungsexperimenten (siehe Abschnitt 4.2.3.1) ermittelten cDNA Volumina eingesetzt. Die Ansätze wurden mit bidestilliertem Wasser auf 50µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden zum Nachweis des Auftretens von Produkthemmungseffekten Reaktionsansätze mit einer 1:10-verdünnten Menge der eingesetzten cDNA angesetzt. Weiterhin wurde als Negativkontrolle bidestilliertes Wasser als Template anstatt cDNA verwendet. Jede Probe wurde mit 30µl ‚Chill-Out‘ Wachs bedeckt, um ein Verdunsten und damit eine Änderung der Konzentrationen während der Reaktionen zu verhindern. Die Desoxynukleotide und die Taq-Polymerase wurden als "Hot Start Mix" zusammen mit 0,5µl H<sub>2</sub>O nach der initialen Denaturierungsphase zugegeben, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Mittels der PCR-Maschine (TRIO-Thermoblock) wurden 35 Zyklen, wie in Tabelle 4.9 beschrieben, durchlaufen.

**Tabelle 4.9: Ablauf der PCR-Zyklen**

Phase		Temperatur (°C)	Dauer
Hotstart		98	10min
Abkühlung und Zugabe von Desoxynukleotiden und Polymerase		72	60s
34 Zyklen	Denaturierung	94	40s
	Annealing	*	40s
	Elongation	72	*
terminale Elongation		72	10min

\* primerspezifisch siehe Tabelle 4.4

Abschließend wurden die Reaktionsgemische auf 4°C abgekühlt und umgehend zur Elektrophorese weiter verwendet. Alle PCR-Experimente wurden pro kanalspezifischem Primer fünf Mal wiederholt.

#### 4.2.4 Elektrophorese

Die Auftrennung und Detektion der PCR Produkte erfolgte unter Verwendung einer Agarosegel-Elektrophorese, wobei die amplifizierte DNA mittels Ethidium-Bromid markiert wurde. Jeweils 10µl der Reaktionsansätze wurden auf diese Weise analysiert. Die Herstellung des Gels erfolgte durch Lösen von Agarose in 0,5-fach konzentriertem TBE-Puffer unter Erwärmung und ständigem Rühren, so dass eine 2-%ige Agaroselösung resultierte. Zur Färbung der DNA-Banden wurde 3µl Ethidium-Bromid zu 100ml Elektrophoresegel hinzugefügt. Das flüssige Gel wurde in die Gießform gegossen und Gelkämme eingesetzt. Nach Erstarren des Geles und Entfernen der Kämme wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gegeben und die Kammer mit 0,5-fach konzentrierten TBE-Puffer aufgefüllt. In die Geltaschen wurden jeweils 10µl PCR-Produkt, zuvor mit 2µl Ladepuffer vermischt, appliziert. Zusätzlich zu den Tumorproben wurde pro Gel je eine Tasche mit der jeweils zugewiesenen Positivkontrolle (siehe Tabelle 4.2) und einer Negativkontrolle (Wasser als Template) bestückt. Als Größen- und Mengenmarker wurden Taschen mit 10µl pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker belegt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120V für 45 min durchgeführt. Anschließend wurden die Gele bei einer Wellenlänge von 312nm auf einem UV-Leuchttisch mit Hilfe einer Polaroid DS-34 Gel Kamera mit Dunkelgelb-Filter und einem H6-EL Tubus (GH10) mit 0,8-facher Vergrößerung dokumentiert. Die Belichtungszeit betrug ¼ Sekunden, die Blende war auf f/16 eingestellt. Als Film wurde ein Polaroid Type 667 film (ISO 3000)

mit einer Entwicklungszeit von 30 Sekunden verwendet. Zur Minimierung des Streulichtes wurden die Kamera und der Leuchttisch abgeschirmt.

#### **4.2.5 Kontrolle der Identität der PCR-Produkte**

Um die Sequenz der amplifizierten PCR-Produkte zu überprüfen, wurde eine DNA-Sequenzierungsanalyse durchgeführt.

##### **4.2.5.1 Gelelution**

Die Banden der PCR-Produkte wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Die Aufreinigung der DNA mit dem *Zymoclean<sup>TM</sup> Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) folgte den Empfehlungen des Herstellers. Die DNA lag am Ende der Aufreinigung in 10µl Wasser gelöst vor.

##### **4.2.5.2 Klonierung**

Für die Klonierung wurde das *TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing* (Invitrogen) verwendet. Nach Herstellerangaben wurde 1µl der aufgereinigten DNA zur primären Topoisomerase-Reaktion eingesetzt. Die Transformation in die zum Kit gehörigen kompetenten Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Des Weiteren wurden 100µl der transformierten Bakterien auf LB/IPTG/X-Gal Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

##### **4.2.5.3 Plasmidpräparation**

Je 4ml LB-Flüssigmedium wurden mit einer Kolonie angeimpft, dabei wurden drei Kolonien pro Platte verwendet. Die Kulturen wurden anschließend im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht angezogen. Mit dem *Plasmid Miniprep Kit* (Biometra) wurden 2ml jeder Kultur nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Plasmid-DNA lag am Ende in 50µl H<sub>2</sub>O vor. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch in einer 1:20-Verdünnung mit dem GeneQuantII-Spektrophotometer bestimmt.

##### **4.2.5.4 Sequenzierung**

Alle klonierten Fragmente wurden mit Hilfe des *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* (Amersham Pharmacia Biotech) sequenziert. Als Sequenzierprimer diente dabei IRD800-M13\_rev (siehe Abschnitt

4.1.5). Reaktionsansatz und -bedingungen richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers. Anschließend wurden 1µl der Sequenzreaktionen im Polyacrylamid-Gel auf dem DNA-Sequencer aufgetrennt und gescannt. Die Sequenzen wurden mit der *Base ImageIR<sup>TM</sup> Version 3.0* Software ermittelt und mit den erwarteten Sequenzen verglichen.

#### **4.2.6 Methoden zur Auswertung**

##### **4.2.6.1 Densitometrische Messungen**

Nach dem Abfotografieren der Gele wurden die Sofortbilder als 8-bit-Grauwerte-Bilder mit einer Auflösung von 400dpi gescannt. Mit Hilfe der Software ImageJ Version 1.22 wurden die Bilddaten ausgewertet. Es folgte eine Kalibrierung der Messfunktion. Dazu wurde der mittlere Grauwert des Gels im Bereich der Negativkontrolle auf Höhe der Größe der jeweiligen Banden und im Bereich der 242bp-Bande des Größen- und Mengenmarkers pUC19/MspI (HpaII) gemessen. Die 242bp-Bande zeigte eine starke Signalintensität und klare Trennung von den anderen Banden des Markers in den Elektrophoresegele. Unter Verwendung eines programmeigenen Kalibrierungswerkzeugs wurde dem Messwert der Negativkontrolle der Wert 0 (Null) und dem Messwert der auf allen Gelen identisch vorhandenen Markerbande der Wert 100 zugeordnet. Die Kalibrierungsfunktion wurde als „straight line“ festgelegt. Nach Abschluss der Kalibrierung erfolgte eine wiederholte Messung der Null- und 100-Werte um die korrekte Kalibrierung sicher zu stellen.

Die eigentliche Messung erfasste den Grauwert jeder einzelnen Bande auf jedem Gel. Dabei musste dieselbe Fläche wie bei der Kalibrierung vermessen werden. Aufgrund der Definition der Kalibrierung wurden bei signalintensiveren Banden hohe und bei signalschwachen niedrige Werte ermittelt. Waren auf Gelbanden in entsprechender Höhe keine Bande sichtbar, wurde gemäß der Negativkontrolle ein Null-Wert gemessen. Aus den Messungen der mehrfachen PCR-Wiederholungen einer Gewebeprobe je untersuchter Kanalisform wurden die Mittelwerte (mGw=mittlere Grauwerte) berechnet, um zufällige Fehler auszugleichen.

Zur Semiquantifizierung der PCR-Produkte nahmen wir eine Unterteilung der Mittelwerte in vier Kategorien vor. Mittelwerte zwischen 1-10 wurden als schwach [(+)], mäßig stark [+] bei einem Wert zwischen 10-70 und als sehr stark [++] bei einem Mittel-

wert größer als 70 bewertet. War keine Bande messbar, wurde die Stärke als negativ [-] bewertet.

#### 4.2.6.2 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte computergestützt mit dem Softwareprogramm SPSS für Windows Version 10.0.7 (Statistical Package for Social Science ®, Inc. Chicago, IL, USA).

Als Variablen ergaben sich: Tumorentität, die mittleren Grauwerte der untersuchten Kanäle (Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1) in den jeweiligen Tumoren und die Grauwerte der Kanäle im gesunden Gehirngewebe. Aus dieser Datenmenge wurden verschiedene Stichproben definiert und auf statistisch signifikante Unterschiede getestet. Zur Untersuchung auf einen Einfluss der Tumorentität auf das Messergebnis wurden die Mittelwerte aus den mittleren Grauwerten für die einzelnen Tumorgruppen errechnet. Zur Überprüfung der Annahme eines auf den Tumorentitäten beruhenden Unterschieds der Mittelwerte wurden die Unterschiede der Mittelwerte einer Isoform in verschiedenen Tumorentitäten auf Signifikanz getestet. Dies wurde mit dem parameterfreien Kruskal-Wallis-Test (H-Test) durchgeführt. Signifikanz wurde bei einer zweiseitigen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen. Stellte sich ein signifikanter Unterschied dar, wurden die Tumorgruppen paarweise untereinander mit dem U-Test nach Mann-Whitney verglichen. Dadurch konnte ermittelt werden, welche Tumorgruppen die Signifikanz bedingten. Die Signifikanz wurde wiederum auf dem 5%-Niveau gesichert.

Da es sich bei den Werten im gesunden Hirngewebe um Daten aus nur einer Probe handelte, und keine symmetrische Verteilung der Werte vorlag, konnte kein parameterfreier Test angewendet werden. Somit war eine Aussage zur Signifikanz eines Unterschiedes zwischen den verschiedenen Kanalisformen im gesunden Gewebe nicht möglich. Ein Vergleich der Werte im gesunden Gehirngewebe konnte nur deskriptiv erfolgen. Der Vergleich zwischen Tumoren und nicht-neoplastischem Gewebe erfolgte ebenfalls rein deskriptiv, da nur eine Probe von letzterem untersucht werden konnte.



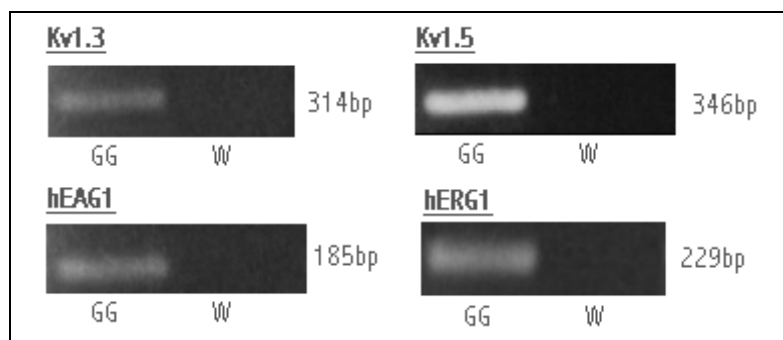
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Kaliumkanäle im nicht-neoplastischen Untersuchungsmaterial und in Zelllinien

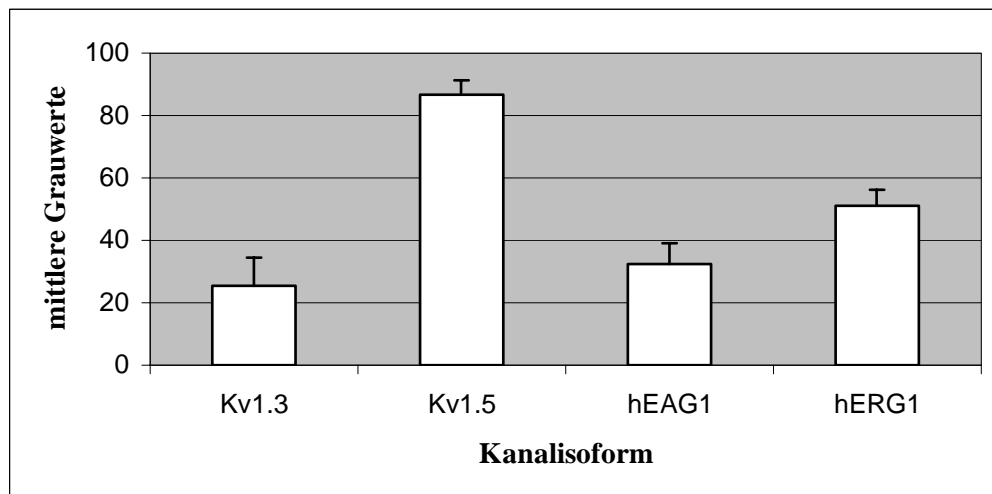
#### 5.1.1 Gesundes Gehirngewebe

Das als gesund diagnostizierte (tumorfreie) Gehirngewebe (bezeichnet als GG) stammte von einem 65-jährigen Patienten und stellte Biopsiematerial dar, das im Rahmen eines neurochirurgischen Eingriffes gewonnen wurde. Die Tumorfreiheit dieser Probe war histopathologisch anhand von repräsentativen Schnitten gesichert worden. Die Gewebeprobe enthielt sowohl Neurone als auch gliale Zellen, sie bestand aus zerebralem Kortex und Marklager.

Von allen untersuchten Kaliumkanal-Isoformen konnte cDNA in dieser Gewebeprobe amplifiziert werden (siehe Abbildung 5.1). Da es sich bei den Messwerten in der tumorfreien Gewebeprobe (GG) um Daten aus nur einer Probe handelte, konnten keine statistischen Tests auf signifikante Unterschiede durchgeführt werden. Ein Vergleich der Werte war daher nur deskriptiv möglich. Die gemessenen mittleren Grauwerte (hier aus 20 PC-Wiederholungen gemittelt) variierten zwischen den jeweiligen Kanaltypen. Der höchste Messwert ( $mGw=87 \pm 5$ ) wurde für die Kaliumkanalisoform Kv1.5 ermittelt. Deutlich niedrigere Werte wurden für Kv1.3 ( $mGw=26 \pm 9$ ) und hEAG1 ( $mGw=32 \pm 7$ ) erreicht. Für die Isoform hERG1 konnte im gesunden Gewebe ein mäßig starkes Signal ( $mGw=51 \pm 5$ ) ermittelt werden. Einen Überblick über die mittleren Grauwerte je untersuchter Kanalisiform im gesunden Gehirngewebe gibt Abbildung 5.2.



**Abbildung 5.1: Elektrophoresegele der untersuchten Kanalisiformen im gesunden Gehirngewebe;** Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen von Kaliumkanälen; GG: gesundes Gehirngewebe; W: Wasser; 314bp, 346bp, 185bp, 229bp: Größe des amplifizierten Fragmentes in Basenpaaren



**Abbildung 5.2: Mittlere Grauwerte der Kanalisoformen im gesunden Hirngewebe;** Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen der Kaliumkanäle; Fehlerindikator: Standardabweichung der mittleren Grauwerte (aus 20 wiederholten Einzelmessungen gemittelt)

### 5.1.2 Zelllinien

Drei verschiedene Zelllinien wurden für die Kanalisoformen Kv1.3, Kv1.5 und hERG1 als Positivkontrollen mit einer bekannten Expression der Kanäle verwendet. Die Zuordnung zu den jeweiligen Kanälen lautete wie folgt: Für die Isoform Kv1.3 wurde die Jurkat-Zelllinie (T-Lymphozyten; Helms et al. 1997, Lewis und Cahalan 1995), für Kv1.5 die HEK-293- Zelllinie (menschliche Nierenzelllinie; Uebele et al. 1996) und für hERG1 die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (Arcangeli et al. 1998, Bianchi et al. 1998) genutzt. Für die Kanalisoform hEAG1 wurde die tumorfreie Hirngewebeprobe (GG: gesundes Hirngewebe) als Positivkontrolle (Occhiodoro et al. 1998, Ludwig et al. 2000, Saganich et al. 2001) verwendet.

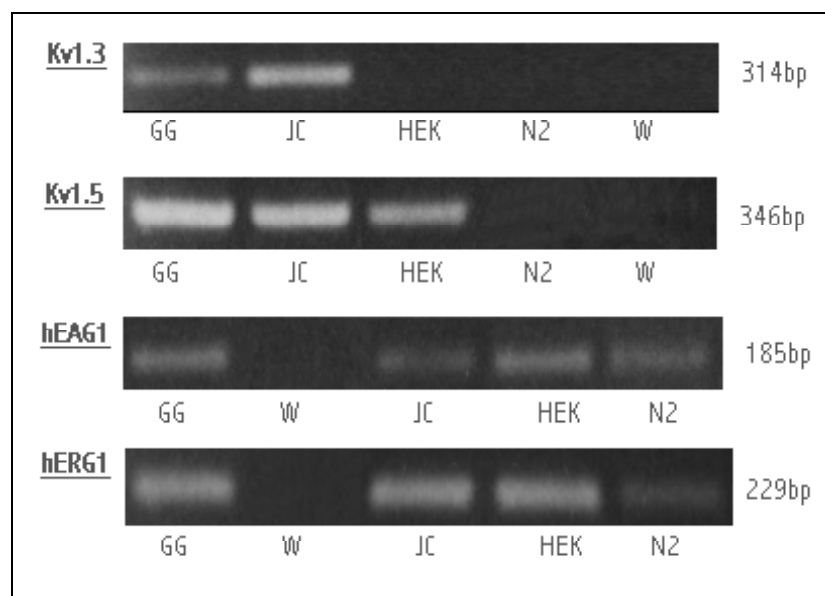
Für jede Kaliumkanalisoform konnte in der jeweils als Positivkontrolle zugeordneten Probe mäßig starke Signale ermittelt werden (siehe Abbildung 5.3).

Die cDNA des Kanals **Kv1.3** wurde nur in der Jurkat-Zelllinie (JC; T-Lymphozytenzelllinie) amplifiziert. Es konnte ein mäßig starker mittlerer Grauwert ( $mGw=56 \pm 4$ ) ermittelt werden. Für alle anderen Zelllinien (HEK: Nierenzelllinie; N2: Neuroblastomzelllinie) ließen sich keine Signale registrieren. Im gesunden Gehirngewebe zeigte sich ein Kv1.3-Messwert von  $26 \pm 9$ . Siehe dazu Abbildung 5.4.

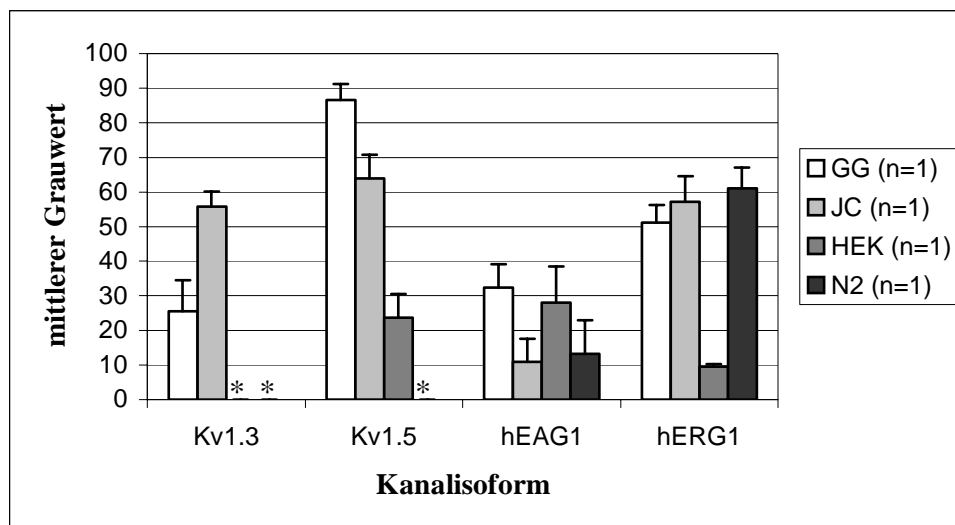
Für den Kanal **Kv1.5** konnte in der HEK-Zelllinie 293 (humane embryonale Nierenzellen) ein mäßig starkes Signal sowie ein mäßig starkes Signal für die Jurkat-Zelllinie ermittelt werden. In der Neuroblastomzelllinie konnte keine cDNA von Kv1.5-mRNA amplifiziert werden. Im gesunden Gehirn zeigte sich ein stärkeres Signal ( $mGw=87 \pm 5$ ). Siehe Abbildung 5.4.

In allen drei Zelllinien ließ sich cDNA der Kanalisiform **hEAG1** etwa gleich stark amplifizieren (siehe Abbildung 5.3). Im gesunden Gehirngewebe ( $mGw=32 \pm 7$ ) konnte ein gering höheres Signal als in den Zelllinien ermittelt werden (siehe Abbildung 5.4).

Bezüglich **hERG1** wurde der größte Messwert innerhalb der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ( $mGw=61 \pm 6$ ) bestimmt. In den Jurkat-Zellen wurden mäßig starke und in den HEK-Zellen schwache Signale ermittelt. Im Vergleich war der mittlere Grauwert im gesunden Gehirngewebe in etwa gleich groß wie die Werte der Neuroblastom- und Jurkat-Zelllinie (siehe Abbildung 5.3 und 5.4).



**Abbildung 5.3: Elektrophoresegele der untersuchten Isoformen im gesunden Gehirngewebe und in Zelllinien;** Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen von Kaliumkanälen; GG: gesundes (tumorfrees) Gehirngewebe; W: Wasser; HEK: humane embryonale Nierenzelllinie; JC: T-Lymphozytenzelllinie (Jurkat-Zelllinie); N2: Neuroblastomzelllinie (SH-SY5Y); 314bp, 346bp, 185bp, 229bp: Größe des amplifizierten Fragmentes in Basenpaaren



**Abbildung 5.4: Mittlere Grauwerte im nicht-neoplastischen Untersuchungsmaterial;\*** In der Probe HEK konnte von dem Kanal Kv1.3 und in der Probe N2 konnten von Kv1.3 und Kv1.5 keine Bande nachgewiesen werden GG: gesundes Gehirngewebe, Wert aus 20 PCR-Wiederholungen; JC: Jurkat-Zelllinie (5 PCR-Wiederholungen), HEK: Nierenzelllinie (5 PCR-Wiederholungen); N2: Neuroblastomzelllinie (5 PCR-Wiederholungen); Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: spezifische Isoformen von Kaliumkanälen; Standardabweichung: ergibt sich aus den PCR-Wiederholungen

## 5.2 Kaliumkanäle in Gliomen

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von drei pilozytischen Astrozytomen (WHO-Grad I), vier diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II), fünf Oligoastrozytomen (eines WHO-Grad II, vier anaplastische WHO-Grad III) und fünf Glioblastome (WHO-Grad IV) untersucht.

Um eine Beschreibung und Bewertung der Messwerte zu gewährleisten, nahmen wir eine Einteilung der Messwerte in vier Kategorien vor. Mittlere Grauwerte von 1-10 wurden als schwach, Werte zwischen 10 und 70 als mäßig stark und als sehr stark bei einem Messwert größer als 70 bewertet. Konnte keine Bande ausgemessen werden (mGw=0), wurde das Signal als negativ bewertet (siehe Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1: Übersicht über die mittleren Signalstärken der verschiedenen Kanalisofor-  
mem in den untersuchten Gliomen**

Probe	Histologie/ WHO-Grad	Kv1.3	Kv1.5	hEAG1	hERG1
1	pA I	(+)	++	++	+
2	pA I	(+)	++	++	++
3	pA I	(+)	+	++	++
4	A II	-	++	+	+
5	A II	(+)	++	+	++
6	A II	+	+	+	++
7	A II	(+)	++	(+)	++
8	OA II	(+)	++	(+)	(+)
9	OA III	+	+	(+)	+
10	OA III	(+)	-	(+)	(+)
11	OA III	(+)	(+)	(+)	+
12	OA III	+	+	(+)	(+)
13	GB IV	+	-	(+)	+
14	GB IV	+	(+)	(+)	+
15	GB IV	+	(+)	+	(+)
16	GB IV	(+)	(+)	+	(+)
17	GB IV	(+)	(+)	(+)	+

pA: pilozytische Astrozytome, A: diffuse Astrozytome, OA: Oligoastrozytome, GB: Glioblastome; I-IV: WHO-Grad I-IV, histologische Malignitätsgrade nach Kleihues und Cavane, 2000; Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen der Kaliumkanäle; -: negativ (mGw=0); (+): schwach (mGw <10), +: mäßig stark (mGw= 10-70), ++: sehr stark (mGw >70)

### 5.2.1 Kv1.3

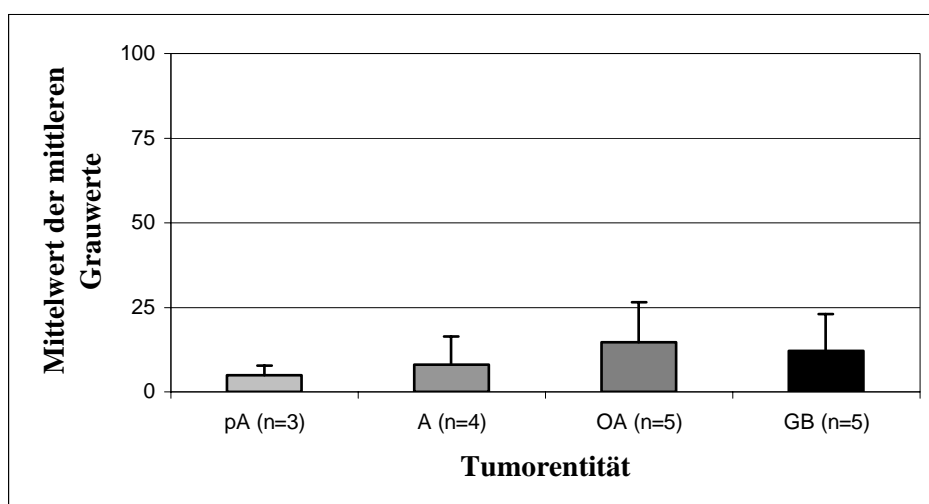
Die Kaliumkanalisoform Kv1.3 wurde in 16 von 17 Tumorproben nachgewiesen (siehe Abbildung 5.5). In einer von einem 38-jährigen männlichen Patienten stammenden Probe eines diffusen Astrozytoms (Probe 4) konnte keine cDNA amplifiziert werden. Die meisten Tumoren (n=10) zeigten ein schwaches Signal, dabei waren alle Tumorentitäten zu in etwa gleich großen Teilen vertreten. Sechs Tumorproben wiesen ein mäßig starkes Signal auf, darunter drei Glioblastome (Proben 13, 14 und 15) und zwei Oligoastrozytome (Proben 9 und 12). Die größte Heterogenität bezüglich der Signalstärken ließ sich in der Gruppe der diffusen Astrozytome (mäßig stark: n=1; schwach: n=2; negativ: n=1) erkennen. Siehe dazu Tabelle 5.1.

Hinsichtlich der Mittelwerte der Signale für die einzelnen Tumorentitäten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,538$ ; Kruskal-Wallis-H-Test). Tendenziell wurden für die pilozytischen Astrozytome der niedrigste ( $5 \pm 3$ ; Median der mittleren Grau-

werte: 4) und die Oligoastrozytome sowie die Glioblastome die höchsten Mittelwerte der mittleren Grauwerte mit 15 ( $\pm 12$ ; Median: 7) bzw. 12 ( $\pm 11$ ; Median: 10) ermittelt. Die diffusen Astrozytome ließen sich mit einem Wert von 8 ( $\pm 8$ ; Median: 6) dazwischen einordnen (Abbildung 5.6).



**Abbildung 5.5: Elektrophoresegele der Isoform Kv1.3;** GG: gesundes Gehirngewebe; JC: Jurkat-Zelllinie (T-Lymphozytenzelllinie) als Positivkontrolle für Kv1.3; 1-17: Probennummern 1-17; W: Wasser; 314bp: Fragmentgröße in Basenpaaren



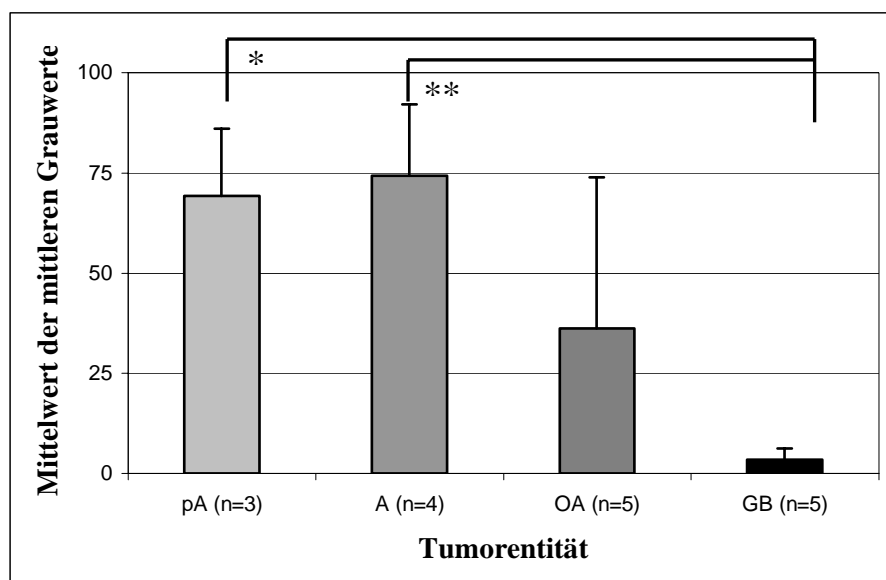
**Abbildung 5.6: Mittelwerte der mittleren Grauwerte je Tumorentität für Kv1.3;** keine statistische Signifikanz nachweisbar; pA: pilozytische Astrozytome; A: diffuse Astrozytome; OA: Oligoastrozytome; GB: Glioblastome; Fehlerindikator: Standardabweichung der Mittelwerte der mittleren Grauwerte/Einzelwerte je Tumorentität

### 5.2.2 Kv1.5

In 15 von 17 Tumorproben (88%) konnte Kv1.5-cDNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.7). Die Messwerte variierten von sehr stark bis negativ. Die Probe eines Oligoastrozytoms WHO-Grad III (Probe 10) und eines Glioblastoms WHO-Grad IV (Probe 13) zeigten kein Signal für die Kanalisiform Kv1.5. Mit Ausnahme der Probe 13 fanden sich bei sämtlichen Glioblastomen äußerst schwache Signale (Mittelwert der mittleren Grauwerte:  $4 \pm 3$ ; Median der mittleren Grauwerte: 4). Hingegen zeigten die pilozytischen Astrozytome und diffusen Astrozytome sehr starke ( $n=2$  bzw.  $n=3$ ) und mäßig starke ( $n=1$  und  $n=1$ ) Signale (siehe Tabelle 5.1). Die Mittelwerte der mittleren Grauwerte betrugen für die pilozytischen Astrozytome  $69 \pm 17$  (Median: 72), für die diffusen Astrozytome  $74 \pm 18$  (Median: 71). Ein besonders hoher Einzelwert ( $mGw=89 \pm 6$ ) in der Gruppe der Oligoastrozytome (Probe 8, 59-jähriger männlicher Patient) stammte aus dem einzigen WHO-Grad-II Oligoastrozytom der Studie. Insgesamt wies die Gruppe der Oligoastrozytome ein sehr heterogenes Signalmuster von sehr stark bis negativ auf (siehe Tabelle 5.1). Der Mittelwert der mittleren Grauwerte betrug in dieser Gruppe  $36 \pm 38$  (Median: 26) (siehe Abbildung 5.8). Statistisch ließ sich mit Hilfe des H-Testes ein genereller Einfluss der Tumorentität auf die Signalstärke sichern ( $p=0,015$ ). Der paarweise Vergleich mittels des U-Testes zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Glioblastome und den pilozytischen sowie diffusen Astrozytomen (siehe Abbildung 5.8). Wegen der geringen Probenanzahl und der relativ hohen Standardabweichung innerhalb der Oligoastrozytome konnte kein signifikanter Unterschied zu den Glioblastomen im U-Test ( $p=0,15$ ) nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.7: Elektrophoresegele der Isoform Kv1.5;** GG: gesundes Gehirngewebe; 1-17: Probennummern 1-17; HEK: *human embryonal kidney cell line* (humane embryonale Nierenzelllinie); W: Wasser; 346bp: Fragmentgröße in Basenpaaren



**Abbildung 5.8: Mittelwerte der mittleren Grauwerte je Tumorentität für Kv1.5;** statistische Signifikanz: \* $p=0,036$ , \*\* $p=0,016$ ; pA: pilozytische Astrozytome; A: diffuse Astrozytome; OA: Oligoastrozytome; GB: Glioblastome; Fehlerindikator: Standardabweichung der Mittelwerte der mittleren Grauwerte

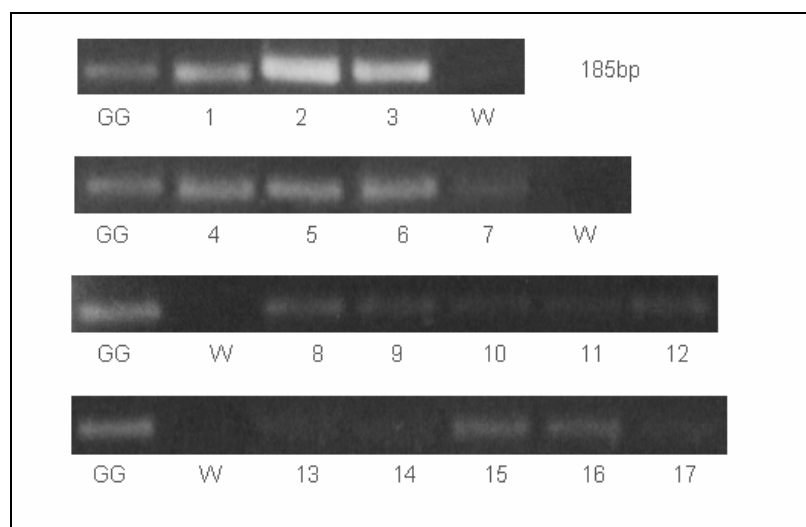
### 5.2.3 hEAG1

In allen Gewebeproben ließ sich cDNA mit hEAG1-spezifischen Primern amplifizieren (siehe Abbildung 5.9). Für die meisten Tumore (53%) konnte ein schwaches Signal ermittelt werden. Den Hauptanteil trugen hierbei die Oligoastrozytome, für jeden Tumor dieser Entität wurde ein schwaches Signal bestimmt. Weitere 29% aller Tumore wiesen mäßig starke Signale und 18% sehr starke Signale auf. Dabei waren alle sehr

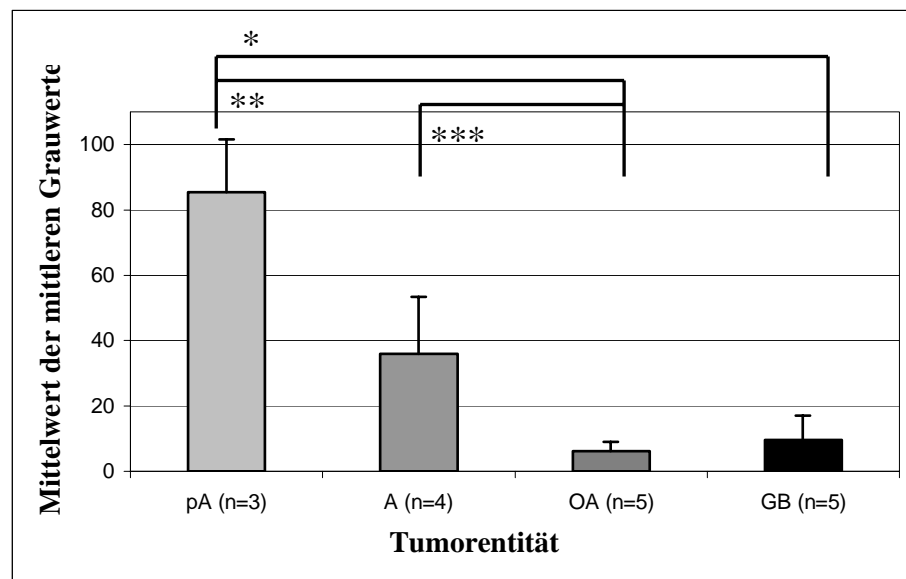


starken Proben pilozytische Astrozytome. Insgesamt betrachtet konnte vor allem bei den pilozytischen Astrozytomen und Oligoastrozytomen ein homogenes Signalmuster ermittelt werden (siehe Tabelle 5.1).

Die Glioblastome (Mittelwert der mittleren Grauwerte der Tumore dieser Entität:  $10 \pm 7$ ; Median der mittleren Grauwerte: 6) und Oligoastrozytome (Mittelwert:  $6 \pm 3$ ; Median: 7) zeigten niedrigere Werte als die diffusen (Mittelwert:  $36 \pm 18$ ; Median: 44) und pilozytischen Astrozytome (Mittelwert:  $86 \pm 16$ ; Median: 84). Auffallend zeichnete sich ein deutlicher Unterschied zwischen den pilozytischen Astrozytomen und allen anderen Tumorentitäten, v.a. den höhermalignen, ab. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-H-Testes ( $p=0,001$ ) ließ sich ein genereller Einfluss der Tumorentität auf die Signalstärke ermitteln. Im U-Test konnte eine statistische Signifikanz für den Unterschied zwischen den pilozytischen Astrozytomen und Oligoastrozytomen ( $p=0,036$ ) sowie Glioblastomen ( $p=0,036$ ), wie auch den diffusen Astrozytomen und Oligoastrozytomen ( $p=0,016$ ) gesichert werden (siehe Abbildung 5.10).



**Abbildung 5.9: Elektrophoresegele der Isoform hEAG1;** GG: gesundes Gehirngewebe; 1-17: Probennummern 1-17; W: Wasser; 185bp: Fragmentgröße in Basenpaaren



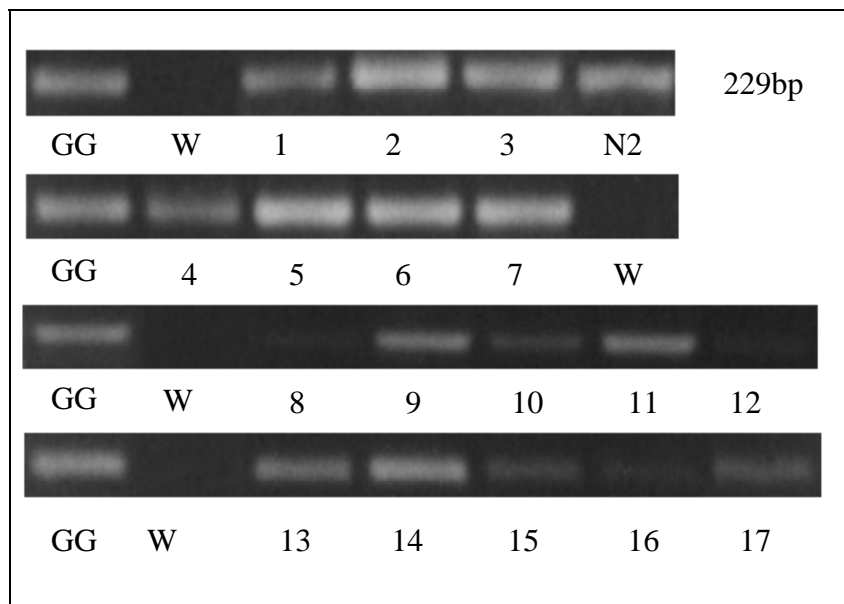
**Abbildung 5.10: Mittelwerte der mittleren Grauwerte je Tumorentität für hEAG1;** statistische Signifikanz: \* $p=0,036$ , \*\* $p=0,036$ , \*\*\* $p=0,016$ ; pA: pilozytische Astrozytome; A: diffuse Astrozytome; OA: Oligoastrozytome; GB: Glioblastome; Fehlerindikator: Standardabweichung der Mittelwerte der mittleren Grauwerte

#### 5.2.4 hERG1

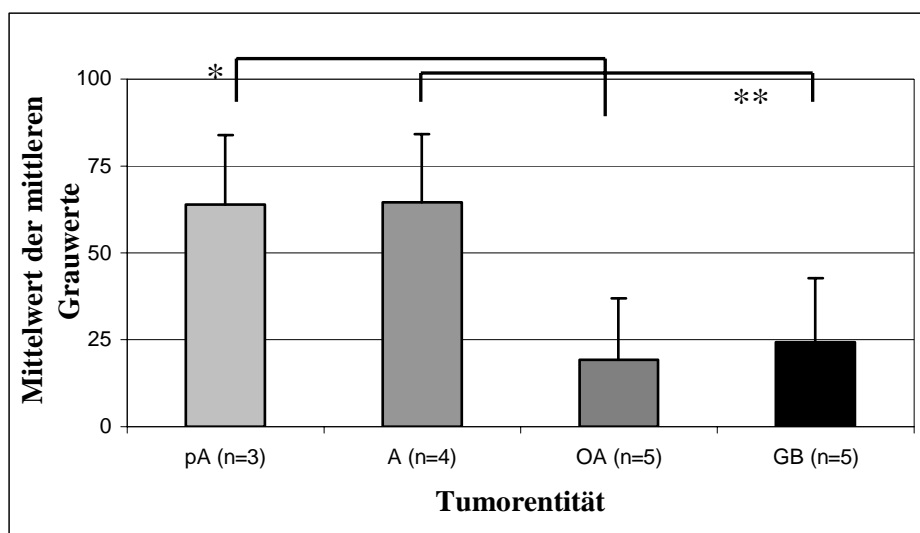
Diese Kanalisform konnte in allen Tumorproben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.11). Dabei wiesen 41% der Tumorproben ein mäßig starkes Signal auf; 29% der Proben zeigten ein sehr starkes und ebenso viele zeigten ein schwaches Signal. Die sehr starken Signalproben wurden von den pilozytischen ( $n=2$ ) und diffusen ( $n=3$ ) Astrozytomen bestimmt; die schwachen Signale wurden bei den Oligoastrozytomen ( $n=3$ ) und Glioblastomen ( $n=2$ ) ermittelt. Die mäßig starken Signale wurden in jeder Tumorentität zu unterschiedlichen Anteilen nachgewiesen (siehe Tabelle 5.1).

Die Mittelwerte der Messwerte zeigten nach Tumorentität gruppiert im H-Test signifikante Unterschiede ( $p=0,011$ ). Die stärksten Signale fanden sich bei den pilozytischen Astrozytomen (Mittelwert der mittleren Grauwerte:  $64 \pm 20$ ; Median der mittleren Grauwerte: 71) und diffusen Astrozytomen (Mittelwert:  $65 \pm 20$ ; Median: 71), deren Werte in etwa gleich hoch waren. Die Oligoastrozytome (Mittelwert:  $19 \pm 17$ ; Median: 9) und Glioblastome (Mittelwert:  $24 \pm 18$ ; Median: 20) zeigten dagegen deutlich geringere Signalstärken. Der Unterschied zwischen den Tumorentitäten ließ sich im U-Test statistisch signifikant für den Unterschied zwischen den pilozytischen Astrozytomen

und Oligoastrozytomen ( $p=0,036$ ) sowie den diffusen Astrozytomen und Glioblastomen ( $p=0,032$ ) sichern (Abbildung 5.12).



**Abbildung 5.11: Elektrophoresegele der Isoform hERG1;** GG: gesundes Gehirngewebe; 1-17: Probennummern 1-17; W: Wasser; 229bp: Fragmentgröße in Basenpaaren

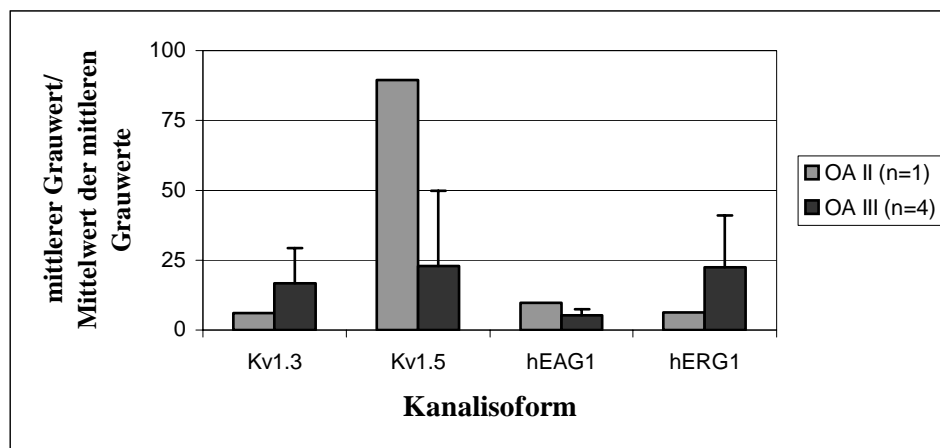


**Abbildung 5.12: Mittelwerte der mittleren Grauwerte nach Tumorentität für hERG1;** statistische Signifikanz: \* $p=0,036$ , \*\* $p=0,032$ ; pA: pilozytische Astrozytome; A: diffuse Astrozytome; OA: Oligoastrozytome; GB: Glioblastome; Fehlerindikator: Standardabweichung der Mittelwerte der mittleren Grauwerte

### 5.3 Vergleich Oligoastrozytom WHO-Grad II / anaplastisches Oligoastrozytom WHO-Grad III

Der Vergleich der anaplastischen Oligoastrozytome (WHO-Grad III; n=4) mit der Probe eines WHO-Grad II Oligoastrozytoms zeigte mit Ausnahme von Kv1.5 (hier sehr starke Signale im Oligoastrozytom Grad II im Vergleich zu den im Mittel mäßig starken Signalen der Oligoastrozytome Grad III) keine Unterschiede zwischen den Malignitätsgraden (siehe Abbildung 5.13).

Dieser Unterschied ließ sich anhand des Vorzeichentests statistisch nicht sichern, da es sich um zu kleine Stichproben handelt.



**Abbildung 5.13: mittlerer Grauwert der Oligoastrozytome WHO-Grad II (n=1) und Mittelwerte der mittleren Grauwerte der Oligoastrozytome WHO-Grad III (n=4) im Vergleich; OA II: Oligoastrozytom WHO-Grad II; OA III: Oligoastrozytom WHO-Grad III; Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen von Kaliumkanälen; Fehlerindikator: Standardabweichung der Mittelwerte der mittleren Grauwerte**

### 5.4 Vergleich zwischen gesundem Gehirngewebe und Tumorgewebe

In der vorliegenden Studie wurde eine Probe nicht-neoplastisches gesundes Gehirngewebe (GG; Biopsiegewebe) von einem 65-jährigen männlichen Patienten stammend, untersucht. Um zu überprüfen, ob bestimmte Isoformen im Vergleich zwischen gesundem Gehirngewebe und Tumorgewebe unterschiedlich starke Veränderungen aufweisen, wurden die jeweiligen Signale im gesunden Gehirngewebe mit denen in den Tumoren gegenübergestellt (Abbildung 5.14).

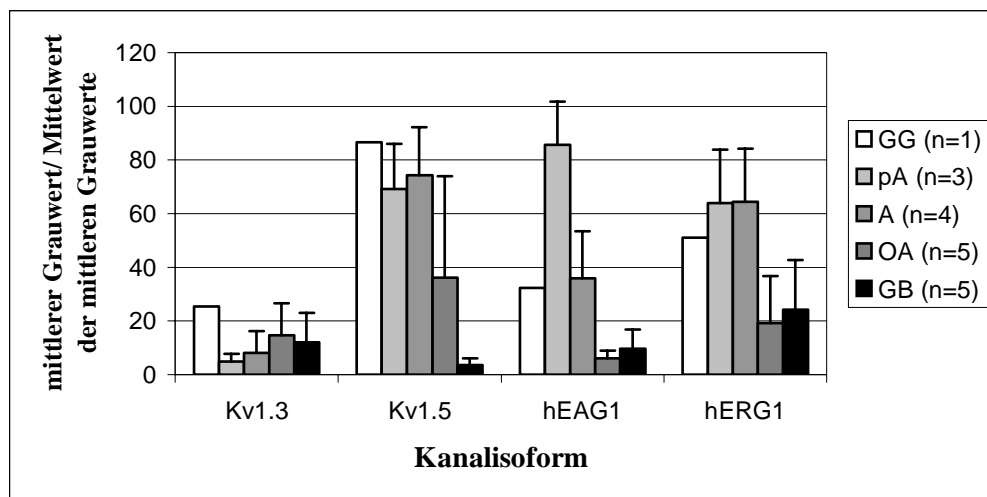
Die Kanalisoform **Kv1.3** scheint im gesunden Gewebe keinen Unterschied in der Signalstärke im Vergleich zur Signalstärke sämtlicher untersuchter Tumorentitäten zu zeigen (siehe Abbildung 5.14). Bei Gegenüberstellung der Werte der einzelnen Tumorenti-

täten mit dem Wert im gesunden Gehirngewebe konnte anhand des Vorzeichentests auch keine Signifikanz ermittelt werden.

**Kv1.5** ließ jedoch eine Tendenz zwischen gesunden Gehirngewebe, niedergradigen Tumoren (pilozytische und diffuse Astrozytome) und höhergradigen Tumoren (Oligoastrozytome, Glioblastome) erkennen. Die Signalstärke im gesunden Gehirngewebe war gering höher als in den niedergradigen Tumoren. Im Vergleich zum gesunden Gehirngewebe als auch zu den niedergradigen Tumoren (pilozytische und diffuse Astrozytome) konnte in den höhergradigen Tumoren (Oligoastrozytome, Glioblastome) deutlich schwächere Signale ermittelt werden (siehe Abbildung 5.14). Im Vorzeichentest konnte dieser Unterschied aufgrund der kleinen Stichprobenmenge statistisch nicht gesichert werden.

Die Isoform **hEAG1** zeigte eine ähnliche Tendenz zwischen den stärkeren Signalen in den niedergradigen Tumoren und den schwächeren Signalen in den höhergradigen Tumoren. Das Signal im gesunden Gehirngewebe war gleich groß wie das Signal in den diffusen Astrozytomen. Auffällig ist im Vergleich dazu der hohe Mittelwert für die pilozytischen Astrozytome ( $86 \pm 16$ ) (siehe Abbildung 5.14). Im Vorzeichentest liess sich zwischen keiner Tumorentität und dem gesunden Gehirngewebe ein signifikanter Unterschied ermitteln.

Auch die Isoform **hERG1** ließ eine Tendenz zwischen den stärkeren Signalen in den niedergradigen Tumoren und im gesunden Gehirngewebe sowie den schwächeren Signalen in den höhergradigen Tumoren (Oligoastrozytome, Glioblastome) erkennen (siehe Abbildung 5.14). Auch hier konnte diese Tendenz statistisch nicht erhärtet werden.



**Abbildung 5.14: Gegenüberstellung der mittleren Grauwerte der Kanalisoformen im gesunden Gehirngewebe und der Mittelwerte der mittleren Grauwerte in den Tumorentitäten;** GG: gesundes (tumorfreies) Gehirngewebe; pA: pilozytische Astrozytome; A: diffuse Astrozytome; OA: Oligoastrozytome; GB: Glioblastome; Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen von Kaliumkanälen; Fehlerindikator: Standardabweichung der Mittelwerte der mittleren Grauwerte je Tumorentität; mittels des Vorzeichentests konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Werten im Gesunden Gehirngewebe und den Werten der einzelnen Tumorguppen bei allen Isoformen ermittelt werden

Mittels des Vorzeichentests konnten bei allen Isoformen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Werten im gesunden Gehirngewebe und den Werten der einzelnen Tumorguppen ermittelt werden. Dies ist aufgrund der geringen Stichprobenmenge erklärbar. Um dennoch eventuelle Unterschiede sichtbar zu machen, wurden pro Isoform Differenzen zwischen dem Wert im gesunden Gewebe und dem Wert in der jeweiligen Tumorprobe gebildet. Der Mittelwert dieser Differenzen, die Standardabweichung und der Median sind in Tabelle 5.2 für jede Tumorgruppe dargestellt.

**Tabelle 5.2: Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung und Median pro Tumorgruppe aus den Differenzen des Einzelwertes im gesunden Gewebe und dem Wert in der jeweiligen Tumorprobe je Isoform**

<b>Tumorentität</b>	<b>Ermittelte Werte der Differenzen</b>	<b>Kv1.3</b>	<b>Kv1.5</b>	<b>HEAG1</b>	<b>hERG1</b>
<b>pA</b>	Mittelwert	20,6	17,4	<b>-53,1</b>	-12,8
	Standardabweichung	2,7	16,8	16,2	19,9
	Median	21,5	14,2	<b>-51,6</b>	-19,5
<b>A</b>	Mittelwert	17,4	12,4	-3,6	-13,4
	Standardabweichung	8,2	17,9	17,5	19,8
	Median	19,1	16,0	-11,8	-20,3
<b>OA</b>	Mittelwert	10,9	50,4	26,2	31,9
	Standardabweichung	11,9	37,7	2,8	17,6
	Median	18,3	60,2	25,4	41,7
<b>GB</b>	Mittelwert	13,4	<b>83,1</b>	22,7	26,8
	Standardabweichung	10,9	2,7	7,2	18,4
	Median	15,5	<b>82,6</b>	26,6	30,9

pA: pilozytische Astrozytome; A: diffuse Astrozytome; OA: Oligoastrozytome; GB: Glioblastome; Kv1.3, Kv1.5, hEAG1, hERG1: Isoformen von Kaliumkanälen; es wurden pro Isoform die Differenzen aus dem mittleren Grauwert im gesunden Gehirngewebe und dem Wert der jeweiligen Tumorprobe gebildet, diese Werte wurden pro Tumorgruppe als Mittelwert, Standardabweichung und Median zusammengefasst dargestellt; die hervorgehobenen Werte kennzeichnen besonders auffällige Differenzen, die einen möglichen Unterschied der Kanalexpressionen zwischen den Geweben vermuten lassen

In Tabelle 5.2 wird der bereits in der Abbildung 5.14 sichtbare mögliche Unterschied der Werte für den Kanal hEAG1 im gesunden Gewebe und in den pilozytischen Astrozytomen veranschaulicht. Der deutlich negative Mittelwert der Differenzen aus dem Wert im gesunden Gehirngewebe und den Werten der pilozytischen Astrozytome lässt erkennen, dass der ermittelte Wert in den pilozytischen Astrozytomen deutlich niedriger als der Wert im gesunden Gewebe ist. Möglicherweise könnte bei Untersuchungen an einer größeren Stichprobenauswahl dieser Unterschied statistisch verifizierbar werden. Ähnliches gilt für den Vergleich der Werte des Kanals Kv1.5 im gesunden Gewebe und in den Glioblastomen. Hier ist der Mittelwert der Differenzen stark positiv, dies hebt den Unterschied eines deutlich höheren Wertes in den Glioblastomen als im gesunden Gewebe hervor.

## 5.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte die korrekte Basenfolge der amplifizierten Sequenzen (nicht gezeigt).

## 6 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression spannungsabhängiger Kaliumkanäle des Kv1-(Shaker)-Typs und der eag-Familie in humanen Gliomen auf mRNA-Ebene untersucht.

Elektrophysiologisch gibt es Hinweise auf das Vorhandensein von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in Gliomen (Pallota 1987, Brismar und Collins 1989a, 1989b, 1989c, Brismar 1995, Ransom 2001). Untersuchungen der einzelnen Kanalisofornen auf molekularbiologischer Ebene hingegen sind spärlich. Aus unserer Studie wird ersichtlich, dass die im ZNS exprimierten Kanalisofornen auch in Gliomen nachweisbar sind. Es konnte festgestellt werden, dass die Stärke der Expression mit der Histologie und dem Malignitätsgrad der Tumoren in Verbindung steht. Die Tendenz, die bereits bei der Untersuchung spannungssensitiver Natriumkanäle feststellbar war, nämlich eine schwächere Expression der Kanäle in höhergradigen Tumoren und eine stärkere Expression der Kanäle in niedergradigen Tumoren (Patt et al. 1996, Labrakakis et al. 1997, Schrey et al. 2002), konnte für einzelne Kaliumkanalisofornen bestätigt werden. Hingegen ergaben sich keine eindeutigen Hinweise darauf, dass die Vermutung eines onkogenen Potentials bestimmter Isofornen, wie es in anderen neoplastischen Zellen beschreiben wurde (Pardo et al. 1999), auf das Expressionsverhalten dieser Isofornen in humanen Gliomen übertragen werden könnte.

Die vielfältige Funktion von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in Gliazellen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Den Kanälen wird u.a. eine Rolle bei der Wachstumsregulierung (Sontheimer 1994) oder der Proliferation (Lepple-Wienhues et al. 1996, Knutson et al. 1997) von Zellen zugeschrieben. Welche spezifische Funktion spannungsabhängigen Kaliumkanälen in Gliomen zukommt, ist bisher nicht bekannt. In Betracht kommt ihre Rolle in Transformation-, Proliferation- oder Migrationsprozessen von Zellen, die bereits in anderen neoplastischen Geweben (Wonderlin und Strobl 1996, Bianchi et al. 1998, Cherubini et al. 2000) nachgewiesen wurde. Des Weiteren könnten die Kanäle für spezifische Eigenschaften bestimmter Tumoren maßgeblich mitverantwortlich sein, wie beispielsweise im Hinblick auf tumorassoziierte Epilepsien (Patt et al. 1996, Patt et al. 2000).



### **6.1 Bemerkungen zur Methodik**

In der vorliegenden Arbeit beschränkt sich die Untersuchung der Kanäle auf die mRNA-Ebene. Der Nachweis von mRNA ist nicht gleichbedeutend mit dem Vorliegen eines funktionellen Kanals in der Membran, da posttranslationelle Modifikationen und Regulationen nicht berücksichtigt werden. Eine Aussage hinsichtlich der Funktionalität der Kanäle ist nicht möglich.

Zu Beginn unserer Experimente war die *realtime*-PCR, welche präzisere Quantifizierungen erlaubt, im Labor für Neuropathologie nicht etabliert, so dass sich die Ergebnisse allein auf die RT-PCR stützen. Dies hatte allerdings den Vorteil, dass ein Vergleich mit den Natriumkanaluntersuchungen von Schrey et al. (2002), welche die selben Tumorproben umfassen und ebenfalls RT-PCR-Experimente darstellen, möglich war. Nach Abschluss der hier vorliegenden Experimente ergab sich jedoch für einige Tumorproben die Möglichkeit einer *realtime*-PCR; diese erzielte mit der RT-PCR vergleichbare Ergebnisse, dargestellt bei Patt et al. 2004.

Bei der Betrachtung der Kanalexpression im gesunden Gehirngewebe wäre die Untersuchung nicht nur an einem größeren Stichprobenumfang interessant, auch Angaben hinsichtlich der Lokalisation der Biopsie sollten einbezogen werden, um lokalisationsbedingte Unterschiede der Kanalexpression (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.2.1) zu untersuchen. Untersuchungen der Proteinebene mittels Immunhistochemie anhand gegen die Kanalproteine gerichtete Antikörper wären ebenfalls wünschenswert. Leider stand uns für diese Studie nicht genügend Frischmaterial zur Verfügung. Ferner haben erste Anwendungen von Antikörpern (der Firma Alomone) keine verwertbaren Ergebnisse erbracht (nicht dargestellt).

### **6.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle im nicht-neoplastischen Untersuchungsmaterial**

#### **6.2.1 Gesundes Gehirngewebe**

In der vorliegenden Studie wurde eine Probe gesundes, tumorfreies Gehirngewebe (Biopsiematerial) verwendet. Alle untersuchten Kaliumkanalisoformen konnten in dieser Probe nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Daten aus der Literatur, die Hinweise auf ein Vorkommen dieser Isoformen im ZNS geben (Gutman et al. 2003, Emmi et al. 2000).

Im Hinblick auf Kv1.5 erwarteten wir ein stärkeres Signal, da für diesen Kanal eine Rolle in *differenzierten Zellen* beschrieben wird (Roy et al. 1996, Schmidt et al. 1999, MacFarlane et al. 2000b). Kv1.3 ist dagegen eher in *proliferierenden, aktivierten Zellen* beschrieben (Nörenberg et al. 1992, 1993, Kotecha und Schlichter 1999, Chittajallu et al. 2002); es wird von einem starken Rückgang der mRNA beim Differenzierungsprozess berichtet (DeCoursey et al. 1996). Kotecha und Schlichter (1999) beschrieben vergleichbare Expressionsmuster für Kv1.5 und Kv1.3 in Untersuchungen an Mikroglia unterschiedlicher Aktivierungs- bzw. Differenzierungsstufe. Diese Befunde decken sich mit den geringen Signalintensitäten für Kv1.3 bei unseren Untersuchungen.

Unsere Untersuchungen ergaben unterschiedlich starke Signale für die einzelnen Kanäle. Der offenbar starke Unterschied zwischen der Expressionsstärke von Kv1.5 und Kv1.3 würde mit den Ergebnissen von Kotecha und Schlichter (1999) übereinstimmen. Allerdings stand für unsere Untersuchungen nur eine Gewebeprobe zur Verfügung, so dass weitere Experimente an mehr Proben zur Absicherung der Ergebnisse nötig sind. Zusätzlich muss gesagt werden, dass mit der von uns verwendeten Methode kein quantitativer Vergleich der Ergebnisse der untersuchten Kanäle untereinander erfolgen kann. Des Weiteren ist im Gehirn eine unterschiedliche Verteilung einzelner Isoformen bekannt (Veh 1995, Bekele-Arcuri et al. 1996, McNamara et al. 1996, Verma-Kurvari et al. 1997, Ludwig et al. 2000, Chung et al. 2001, Saganich et al. 2001, Gutman et al. 2003, Papa et al. 2003). Bei fehlenden Angaben zur genauen Lokalisation der Biopsie können wir keine Aussagen über einen lokalisationsbedingten Unterschied der ermittelten Signalstärken machen.

Die Expression von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in *Neuronen* ist für den Erregungsablauf essentiell. Bisherige Untersuchungen an Neuronen ließen neben der Lokalisation im Gehirn auch am peripheren Nerven Unterschiede zwischen den Kanalisoformen erkennen (Veh et al. 1995, Verma-Kurvari et al. 1997, Saganich et al. 2001).

*Gliazellen*, z.B. Astrozyten, exprimieren vier Typen von Kaliumkanalströmen (MacVicar 1984, Sontheimer 1994, Bordey und Sontheimer 1998, Bychkov et al. 2001). Anhand ihrer pharmakologischen und kinetischen Eigenschaften wurden u.a.  $IK_{DR}$  und  $IK_{IR}$  identifiziert (Barres et al. 1990, McManus 1991, Sontheimer 1994, Bordey et al. 1995, Ransom et al. 1996, Akopian et al. 1997). Diese Ströme wurden intensiv in primären Kulturen oder Hirngewebschnitten untersucht (Quandt und MacVicar 1986,

Chvatal et al. 1995, Ransom und Sontheimer 1995, Bordey und Sontheimer 1998, D'Ambrosio et al. 1999). So konnten Unterschiede im Vorkommen der Stromart (MacFarlane et al. 1997, Bordey et al. 1998, Koller et al. 1998, MacFarlane et al. 2000a, Boucsein et al. 2000, Li et al. 2001) und in der Expression der jeweiligen Kanalisofor-men in Abhängigkeit vom *Entwicklungsstadium* der Zelle und *Zellart* sowie *Lokalisa-tion* nachgewiesen werden (Nörenberg et al. 1992, 1993, Roy et al. 1996, Kotecha und Schlichter 1999, Schmidt et al. 1999, Emmi et al. 2000, MacFarlane et al. 2000b, Chit-tajallu et al. 2002). Eine vorherrschende Kanalexpression spezifischer Isoformen in be-stimmten Zelltypen könnte für die Zelle von funktioneller Bedeutung sein.

Roy et al. (1996) beschrieben die Isoform Kv1.5 als Hauptkanal für die Generation des  $IK_{DR}$  in Astrozyten. Interessanterweise konnte in unserer Arbeit für Kv1.5 in der gesun-den Gehirngewebsprobe das stärkste Signal im Vergleich mit den anderen Isoformen ermittelt werden. Wie bereits erwähnt ist diese zwischen den Kanalisofor-men vergleichende Beobachtung aufgrund der verwendeten Methodik und des geringen Stichpro-benumfangs nur eingeschränkt zu bewerten.

### **6.2.2 Zelllinien**

Wir verwendeten als Positivkontrollen Zelllinien, in denen die Expression der jeweili-gen Kaliumkanalisoform bekannt ist (siehe Material und Methodik Abschnitt 4.1.2 Ta-belle 4.2). Jede Isoform konnte wie erwartet in der ihr jeweils zugeordneten Positivkon-trolle nachgewiesen werden.

### **6.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle in Gliomen**

In unseren Ergebnissen ist zwischen den verschiedenen Tumorentitäten ein Unterschied hinsichtlich des mRNA-Nachweises für spannungsabhängige Kaliumkanäle ersichtlich. Das Vorhandensein dieser Kanäle bzw. ihrer Ströme in Hirntumoren ist auf elektrophy-siologischer Ebene gezeigt worden (Pallota 1987, Brismar und Collins 1989a, 1989b, 1989c, Brismar 1995, Patt et al. 1996, Chin et al. 1997, Labrakakis et al. 1997, Ransom 2001). Molekularbiologische Untersuchungen zur Identität der jeweiligen Isoformen sind spärlich bzw. nicht vorhanden. Welche funktionelle Rolle spannungsabhängige Kaliumkanäle in diesen Zellen spielen und ob es vorherrschende Isoformen gibt, wurde bislang nicht geklärt. Unsere Arbeit lässt erkennen, dass die Grundlage der elektrophy-

siologischen Befunde an humanen Gliomen eine Kombination von verschiedensten Kanalisoformen sein könnte.

Teilweise waren signifikante Unterschiede im Expressionsmuster der Tumoren erkennbar. In jeder Tumorentität wurden sämtliche untersuchten Isoformen, allerdings in unterschiedlichem Maße, nachgewiesen.

Tendenziell konnten in höhergradigen Tumoren ein geringerer mRNA-Nachweis einzelner Kanalisoformen als in den niedriggradigen, gut differenzierten Tumoren erzielt werden. Diese Beobachtungen stimmen mit Untersuchungen von spannungssensitiven Natriumkanälen in humanen Gliomen überein (Schrey et al. 2002).

### **6.3.1 Expression von Kv1.3 und Kv1.5 in Gliomen**

#### **6.3.1.1 Unterschiede zwischen den Tumorentitäten**

Anhand von Untersuchungen der Shaker-Kanäle in Gliazellen ist eine Assoziation von Kv1.5 und Kv1.3 mit dem Zellzyklus bzw. der Proliferation bestimmter Gliazellen gezeigt worden (Attali et al. 1997, MacFarlane und Sontheimer 2000b, Chittajallu et al. 2002). Es wurden Veränderung des Expressionsmusters bzw. der Ströme in Abhängigkeit vom Proliferations- und Differenzierungsstatus der Zelle sowie der Zellart beschrieben. So konnte beispielsweise beim Übergang von ruhenden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in den aktivierten / proliferierenden Zustand ein selektiver Anstieg der Kv1.3- und Kv1.5- Proteinexpression festgestellt werden (Chittajallu et al. 2002). Eine Blockade der Kanäle erniedrigte die Proliferationsraten in normalen Gliazellen (Attali et al. 1997, Chittajallu et al. 2002). Allerdings gibt es Unterschiede hinsichtlich des Kanaltyps, der blockiert wurde. Des Weiteren machen Arbeiten an Lymphozyten, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen zelltypabhängige Unterschiede im Kanalmuster deutlich (Attali et al. 1997, Kotecha und Schlichter 1999, Chittajallu et al. 2002, MacFarlane und Sontheimer 2000b).

Gliome stammen von astrozytären als auch oligodendrozytären Zellen ab, d.h. es liegen unterschiedliche Zelltypen in den einzelnen Gliomen vor (siehe Einleitung Kapitel 2.1). Es gibt Tumore niederer und hoher Malignität. Der Proliferations- und Differenzierungsstatus der Zellen ist zwischen den Tumorentitäten verschieden. Aufgrund der beobachteten Änderung der Kanalexpression in Abhängigkeit des Proliferations- und Diffe-

renzierungsstatus in *nicht neoplastischen Gliazellen* (Kotecha und Schlichter 1999) vermuteten wir einen differenzierten mRNA-Nachweis von Kv1.3 und Kv1.5 in den verschiedenen Tumorentitäten.

In unseren Ergebnissen konnte für die Kaliumkanalisoform Kv1.5 tatsächlich eine differenzierte Expression des Kanals zwischen den Tumorentitäten festgestellt werden. Tendenziell war ein *hohes* Niveau der Expression von Kv1.5-mRNA in *niedergradigen* Gliomen (pilozytische Astrozytome) und ein *niedriges* Niveau in *höhergradigen* Gliomen (Glioblastome) zu verzeichnen, vergleichbar der Expression von Natriumkanälen (Schrey et al. 2002). Diese Unterschiede der Expressionsstärke konnten für manche Tumorentitäten mit statistischer Signifikanz gesichert werden.

Die Kanalisoform Kv1.3 zeigte jedoch keine solche Tendenz unter den Tumorentitäten. Das Expressionsmuster von Kv1.3 in den Hirntumoren war heterogen. Mit Ausnahme der Glioblastome lassen unsere Ergebnisse einen geringeren Nachweis von Kv1.3-mRNA als Kv1.5-mRNA in den verschiedenen Gliomen vermuten.

Die differenzielle Kv1.5-Expression in den Tumoren könnte eine Bedeutung für die biologische Wertigkeit von Gliomen haben. Aufgrund des niedrigen Expressionslevels in höhergradigen Gliomen scheint der Kanal eine untergeordnete Rolle für diesen Tumorgang zu spielen. Seine Bedeutung für die Malignität kann daher als gering eingeschätzt werden.

Welche Rolle der Kanal in niedergradigen Gliomen spielt, ist unklar. Hätte sich ein Unterschied der Expressionsstärke von Kv1.5 in den niedergradigen Tumoren und im gesunden Gehirngewebe ergeben, wäre dies von besonderer Bedeutung gewesen. Allerdings war die Signalstärke in den Tumoren nur geringgradig geringer als im gesunden Hirngewebe bzw. etwa gleich stark. Eine präzisere Diskussion lassen die Ergebnisse der Normalgewebsprobe nicht zu.

#### 6.3.1.2 (Kv1) Shaker-Kanäle und ihr Bezug zu Proliferation und Differenzierung von Zellen

Das Expressionsverhalten der untersuchten Kanalisoformen ist vom Differenzierungs- und Proliferationsstatus der Zelle sowie von der Zellart abhängig (Attali et al. 1997,

Kotecha und Schlichter 1999, MacFarlane und Sontheimer 2000b, Chittajallu et al. 2002).

Für den Kanal Kv1.3 ist eine essentielle Funktion für die Proliferation von T-Lymphozyten bekannt (Helms et al. 1997, Khanna et al. 1999, Levite et al. 2000). Ebenso konnte in verschiedenen Gliazellen im aktivierten bzw. proliferierenden Zustand eine besonders hohe Expression von Kv1.3 nachgewiesen werden (Nörenberg et al. 1992, 1993, Kotecha und Schlichter 1999, Chittajallu et al. 2002). In unseren Untersuchungen konnte die mRNA des Kanals in sämtlichen verschiedenen Arten von Gliomen nachgewiesen werden. Obwohl *kein* Zusammenhang der Kv1.3-Expression mit den Tumorentitäten und Malignitätsgraden dargestellt werden konnte, ist sein Nachweis gut mit Arbeiten, die eine Kv1.3-Expression in proliferierenden normalen Gliazellen zeigen, vereinbar. Es unterstreicht, dass Kv1.3 auf universeller Weise für die Proliferation von Zellen beider Arten, nicht-neoplastisch und neoplastisch, von Bedeutung ist.

Kotecha und Schlichter (1999) untersuchten Microgliazellen der Ratte im Bereich des Hippocampus. Ihre Untersuchungen zeigten Kv1.3-ähnliche Ströme in proliferierenden Zellen und Kv1.5-ähnliche Ströme in ruhenden nichtproliferierenden (differenzierteren) Zellen. Mittels immunzytochemischer Methoden gelang der Nachweis einer Verlagerung hinsichtlich der Expression und Lokalisation der Kanalproteine: Im Laufe der Zeit (mit Zunahme des Anteils proliferierender Zellen in der Kultur) verschwanden Kv1.5-Kanalproteine von der Oberfläche und Kv1.3-Kanalproteine erschienen. Dieser Wechsel korrelierte mit dem Einsatz kanalspezifischer Blocker, die je nach vorherrschenden Kanalisofom die Proliferation der Zellen hemmten. Anhalte für ein ähnliches Muster einer gegenläufigen Expression (*switch*) von Kv1.3 und Kv1.5 in Abhängigkeit des Differenzierungs- und Proliferationsstatus der Zelle, wie sie in der Arbeit von Kotecha und Schlichter (1999) bei Mikroglia beschrieben wurde, konnte in unserer Arbeit für Gliome nicht gefunden werden.

Hingegen stimmt unser Nachweis eines höheren Anteils von Kv1.5-mRNA in niedergradigeren Gliomen (höherdifferenzierter, weniger proliferierende Tendenzen) und ein geringerer Anteil in höhergradigen Gliomen (geringer differenziert, höhere proliferierende Tendenzen) gut mit der Beobachtung überein, dass der Anteil an Kv1.5-Kanalproteine mit Zunahme der proliferierenden (undifferenzierteren) Zellen in der Zellkultur abnimmt (Kotecha und Schlichter 1999). Hierbei muss beachtet werden, dass

Mikroglia nicht mit Gliazellen gleichzusetzen sind und aufgrund des unterschiedlichen Zelltyps Unterschiede erklärbar sind.

Des weiteren konnte beobachtet werden, dass eine alleinige Blockade von Kv1.5 zur Erniedrigung der Proliferation nur in *Astrozyten* (MacFarlane und Sontheimer 2000b), aber nicht in oligodendrozytären Zellen ausreichend war (Attali et al. 1997, Chittajallu et al. 2002). Unser Ergebnis, dass dieser Kanaltyp hauptsächlich in niedergradigen Astrozytomen (astrozytäre Ursprungszellen) exprimiert wird und nur eine niedrige oder fehlende Expression in Oligoastrozytomen (u.a. oligodendrozytäre Ursprungszellen) und Glioblastomen aufweist, stimmt damit überein. Dies lässt vermuten, dass die Proliferation von Zellen niedriggradiger Astrozytomen wie die normaler Astrozyten in gewissem Grad durch eine Kv1.5 Expression reguliert sein könnte. Das kann allerdings nicht in auf Oligoastrozytome und insbesondere Glioblastome übertragen werden. Seine Rolle in diesen Zellen ist daher vermutlich eine andere.

Kv1.5 könnte demnach verschiedene funktionelle Rollen besitzen: z.B. einerseits bei der Proliferation bestimmter Zelltypen (in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Zellen, eher hochdifferenzierte Zellen), andererseits könnte der Kanal als Tumorsuppressor für verschiedene Typen von Gliomen fungieren.

#### 6.3.1.3 Markerfunktion von Kv1.5?

Bezüglich unserer Daten und den Ergebnissen der oben genannten Studien betrachtet, kann folgende Hypothese aufgestellt werden: die Suppression intrinsischer Kanalexpression (d.h. von den Kanälen, die normalerweise in differenzierten neuronalen Zellen - welche als Ursprungszellen der Gliome angesehen werden - vorhanden sind) kann ein Kennzeichen von speziellen Typen von Gliomen sein, insbesondere solche höherer Malignität. Dem angedeuteten Unterschied der Expression von Kv1.5 zwischen gesunden Gehirngewebe und niedergradigen Astrozytomen sollte nachgegangen werden, um Hinweise hinsichtlich der vermuteten Rolle von Kv1.5 als Differenzierungsmarker beurteilen zu können.

Im Hinblick dieser Ergebnisse ist es wichtig zu bemerken, dass Genexpressions-Studien bereits in der Lage sind, eine Vielzahl von Genen zu identifizieren, die mit dem klinischen Verlauf der Tumorpatienten assoziiert werden können. In diesem Zusammenhang konnte die Ionenkanalexpression in Korrelation mit dem günstigeren klinischen Verlauf bei einer anderen Klasse von Hirntumoren, den Medulloblastomen, gestellt werden

(Pomeroy et al. 2002). Es ist somit lohnenswert, das Profil der Ionenkanalexpression an einer größeren Anzahl an Gliompatienten einschließlich der Beurteilung ihrer klinischen Entwicklung zu untersuchen. Kv1.5 erscheint diesbezüglich ein möglicher „Marker“, der getestet werden könnte.

### **6.3.2 Expression von hEAG1 und hERG1 in Gliomen**

Die Isoformen hEAG1 und hERG1 werden zwar auf Grund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten zu einer Familie subsummiert, allerdings nimmt der Kanal hERG1 durch seine Eigenschaften eines *einwärts* gerichteten Gleichrichters (inward rectifying) (Trudeau et al. 1995, Smith et al. 1996, Wang et al. 1997, Übersicht: Schwarz und Bauer 2004) funktionell eine Sonderrolle ein. Auf Grund der daraus resultierenden unterschiedlichen funktionellen Bedeutungen werden die Kanäle getrennt voneinander betrachtet.

#### **6.3.2.1 hEAG1 - eine Bedeutung für Gliome?**

Die hEAG-Kanäle gehören zur Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanälen mit  $K_{DR}$ -Charakteristik, d.h. mit Eigenschaften eines verzögernd gleichrichtenden Kaliumkanals (Bauer und Schwarz 2001). Sie werden durch Depolarisation aktiviert, dies ist u.a.  $Mg^{2+}$ -abhängig (Terlau et al. 1996). Durch  $Ca^{2+}$ /Calmodulin können die Kanäle gehemmt werden (Stansfeld et al. 1996, Schönherr et al. 2000).

In nicht-erregbaren Zellen ist die Hauptaufgabe von Kaliumkanälen die Kontrolle des Ruhemembranpotentials (RMP). Tumorzellen weisen typischerweise ein depolarisiertes RMP von  $-20mV$  bis  $-40mV$  auf. Hier fehlen die klassischen einwärts gleichrichtenden Kanäle (Bianchi et al. 1998). Es wird angenommen, dass das RMP durch eag-Kanäle auf diese Werte erniedrigt wird. Depolarisierte RMPs bilden eine Grundlage für intensive Hyperpolarisationen, die zwischen der frühen G1-Phase und dem Übergang in die S-Phase im Zellzyklus auftreten (Nilius und Droogmans 1994). Durch diese, durch die Aktivierung der Kaliumkanäle ermöglichte Hyperpolarisation der Membran wird wahrscheinlich eine ausreichend starke Antriebskraft für einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom erzielt (Nilius et al. 1993). Die dadurch erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte sind für die Zellzyklus-Progression relevant (Wonderlin und Strobl 1996, Meyer et al. 1999). hEAG-Kanäle, deren Expression als Zellzyklus abhängig beschrieben wurde, könnten so mit der Proliferation von Zellen, möglicherweise besonders von Tumorzellen, in Verbindung stehen. Dies lässt



eine erhöhte Expression von hEAG in proliferierenden Zellen bzw. Tumorzellen vermuten. In diesem Zusammenhang wurde von einem *onkogenen Potential* gesprochen (Pardo et al. 1999).

Tumore des ZNS wurden bisher noch nicht auf die Expression von EAG-mRNA untersucht. In normalen Zellen außerhalb des ZNS konnte EAG-mRNA nicht nachgewiesen werden, in verschiedenen Tumorzelllinien hingegen werden die Kanäle exprimiert (Meyer et al. 1999, Pardo et al. 1999, Ouadid-Ahidouch et al. 2001). Da die Hemmung der Kanalexpression eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation in *nicht-ZNS-Tumoren* nach sich zieht (Pardo et al. 1999), scheinen die EAG-Kanäle dort ein onkogenes Potential zu haben.

In den pilozytischen Astrozytomen konnten wir eine Überexpression von hEAG1 im Vergleich zum gesunden Hirngewebe feststellen. Dies stimmt mit dem vermuteten onkogenen Potential überein. Inwieweit der auffällige Unterschied zwischen dem mäßig starken Signal im gesunden Hirngewebe und dem starken Signal in den pilozytischen Astrozytomen statistisch signifikant ist, muss an einer größeren Stichprobe getestet werden. Für einen tatsächlichen Unterschied sprechen die von uns ermittelten großen Mittelwerte bzw. Median der Differenzen aus den Signalwerten im gesunden Gewebe und in pilozytischen Astrozytomen (im Vergleich zu den Differenzen anderer Tumorentitäten).

Allerdings ist die erniedrigte Expression von hEAG1 in den höhermalignen Gliomen, wie in unserer Arbeit gezeigt wurde, widersprüchlich zu der Hypothese des onkogenen Potentials. Andererseits konnten ähnlich niedrige Expressionswerte von hEAG in neoplastischen hematopoetischen Zelllinien beobachtet werden (Smith et al. 2002).

Die niedrige hEAG1-Expression in den von uns untersuchten *malignen* Gliomen könnte auf das niedrige zelluläre Differenzierungsstadium, welches typisch für diese Tumoren ist (Louis et al. 2001), zurückgeführt werden. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass unreife normale (fetale) ZNS Zellen niedrige (Arcangeli et al. 1997, Crociani et al. 2000) oder fehlende hEAG-Expression (Occhiodoro et al. 1998, Pardo et al. 1999) aufweisen, während EAG-Kanal-Untereinheiten überall im differenzierten erwachsenen Gehirn exprimiert werden (Ludwig et al. 1994, Occhiodoro et al. 1998; Pardo et al. 1999, Saganich et al. 2001).

Allerdings ist der Anteil *glialer* hEAG-mRNA in Bezug zu diesen Ergebnissen unbekannt. Unseres Wissens wurde EAG bisher nur in Neuronen nachgewiesen (Saganich et

al. 2001). Ferner gibt es trotz des Nachweises der hEAG-mRNA-Expression bisher keine Nachweise von endogener, eag-vermittelter *Ströme* in (neuronalen) Geweben (Bauer und Schwarz 2001). Man könnte daher spekulieren, dass einzig das *Vorhandensein des Proteins* und nicht nur seine funktionelle Form in der Plasmamembran ausreichend für die nachgeschalteten zellbiologischen Prozesse ist.

Die physiologische Rolle von EAG-Kanälen bleibt noch weitgehend unverstanden und bedarf weiterer Untersuchungen.

#### 6.3.2.2 hERG1- eine essentielle Bedeutung auch für Tumore des ZNS?

Der Kaliumkanal hERG1 weist zwar die molekulare Struktur der klassischen spannungsabhängigen Kaliumkanäle auf, zeigt aber eine *einwärts* gerichtete gleichrichtende Eigenschaft (inward rectification) sowie eine starke  $[K^+]_o$  Abhängigkeit (Bianchi et al. 1998). In Tumorzellen, die nicht die klassischen einwärts gerichteten gleichrichtenden Kaliumkanäle besitzen, trägt wahrscheinlich hERG zum Erhalt der depolarisierten Membranpotentiale bei (Binggeli und Weinstein 1986, Bauer und Schwarz 2001). Diese sind für einen kontinuierlichen Eintritt der Zellen in den Zellzyklus essentiell (Bianchi et al. 1998). Es wird darüber spekuliert, dass das Vorhandensein von hERG für Tumorzellen einen selektiven Vorteil darstellt (Bianchi et al. 1998).

Das Vorhandensein von hERG scheint nicht nur zellart- und lokalisationsabhängig, sondern auch vom Proliferations- bzw. Differenzierungsstatus abhängig zu sein. Im ZNS werden ERG-Kanäle hauptsächlich in *unreifen Neuronen* exprimiert (Arcangeli et al. 1997, Wang et al. 2002). Bei der Untersuchung *reifer* Neuronen (adultes Gewebe) konnte ERG nur in einer sehr niedrigen Dichte in hippocampalen pyramidalen Neuronen und Granulazellen (Zellkörper und proximale Dendriten) nachgewiesen werden (Bauer und Schwarz 2001).

In Gliazellen werden die ERG Kanäle in differenzierten Astrozyten exprimiert (Emmi et al. 2000), dabei könnten die Kanäle in der Regulation der Kalium-Homöostase einbezogen sein (Bauer und Schwarz 2001). Oligodendrozyten zeigen keine ERG Expression (Emmi et al. 2000). Hinsichtlich den ERG Isoformen kommt ERG1 in neuralem als auch nicht- neuralem Gewebe vor – der Kanal wird u.a. im Herz (Wymore et al. 1997), Gehirn und sympathischen Ganglien (Shi et al. 1997) exprimiert – während die Expression von ERG2 und ERG3 auf neurales Gewebe (Nervensystem) begrenzt ist (Shi et al.

1997). Unser Nachweis von hERG1-mRNA im gesunden humanen adulten Gehirn ist mit diesen Studien vereinbar.

Hinsichtlich der zellulären Beschaffenheit der Tumore gibt es interessante Übereinstimmungen mit ihren mutmaßlichen Ursprungszellen im Hinblick auf das Expressionsmuster von hERG1. Zellen von Oligoastrozytomen und normale Oligodendrozyten zeigen beide eine niedrige hERG1-Expression, während Zellen von differenzierten Astrozytomen und reifen normalen Astrozyten ebenfalls beide hohe Kanalexpression aufweisen (vergleiche Emmi et al. 2000). Die hohe hERG1-Expression in Astrozytomen korreliert mit dem von Bianchi et al. (1998) beschriebenen hERG-assoziierten selektiven Vorteil für das Tumorstadium. Jedoch lässt die verminderte Expression von hERG1 in den höhermalignen Tumorstadien eine Verbindung mit *malignen* Wachstum fraglich erscheinen.

Die niedrige hERG1 Expression in den malignen Gliomen ist überraschend, da bisher untersuchte maligne Tumorzelllinien und Primärtumore außerhalb des ZNS eine deutliche hERG-mRNA-Expression (Bianchi et al. 1998, Pancrazio et al. 1999, Cherubini et al. 2000, Smith et al. 2002) sowie erhöhte Proteinspiegel und eine hohe Dichte von funktionellen Kanälen aufwiesen (Bianchi et al. 1998, Meyer und Heinemann 1998, Arcangeli et al. 1999, Pancrazio et al. 1999, Cherubini et al. 2000, Smith et al. 2002, Bauer et al. 2003). Hinzu kommt, dass Untersuchungen des Zellwachstums an hämatopoetischen Zelllinien eine reduzierte Zellproliferation nach Applikation des selektiven hERG-Kanalblockers E-4031 erbrachten und damit einen direkten Hinweis auf eine funktionelle Rolle des hERG Stroms in Tumorzellen liefern (Smith et al. 2002). Auf Grund unserer Ergebnisse scheint die ERG Expression in Gliomen verschieden zur Expression in nicht-neuralen Tumoren zu sein. Es ist daher anzunehmen, dass der Kanal hERG1 *nicht* mit dem malignen Wachstum von *Gliomen* verknüpft ist.

#### **6.4 Niedrigere Ionenkanalexpressionsstärken in malignen und höhere in benignen Gliomen – ein generelles Phänomen?**

Unsere Ergebnisse der *niedrigen Expression* von Kv1.5 als Mitglied der *Shaker*-Familie sowie hEAG1 und hERG1 als Mitglieder der *eag*-Familie in *höhergradigen Gliomen* und eine ähnliche Herunterregulierung von Natriumkanälen (Schrey et al. 2002) und BK-Kanälen (Brodoehl 2005) im selben Tumorstadium sprechen für ein generelles Phäno-

men in Gliomen. Diese Beobachtung des Fehlens von Natriumkanal-Subtypen in Glioblastomen bestätigen elektrophysiologische Daten, die eine niedrigere Natriumkanal-Dichte in Zellen von höhergradigen Gliomen zeigten (Ullrich et al. 1998). Im Gegensatz dazu werden andere Natriumkanal-Subtypen, z.B. Nav1.1, Nav1.2 und Nav1.3, reichlich in niedergradigen Gliomen exprimiert und zu einem geringeren Maße auch in höhergradigen Oligodendrogliomen (Schrey et al. 2002). Aufgrund dieser Befunde kann man spekulieren, dass eine *Suppression der intrinsischen Kanalexpression* ein generelles Kennzeichen von höhergradigen Gliomen darstellen könnte. Im Gegensatz dazu scheinen niedergradige Gliome eher durch eine generelle Überexpression von Ionenkanälen charakterisiert zu sein (z.B. hEAG1 in pilozytischen Astrozytomen). Des Weiteren kann beobachtet werden, dass einige Kanalarten beinahe ausschließlich in einzelnen Gliomaentitäten exprimiert werden, wie z.B. Nav1.6 in pilozytischen Astrozytomen (Schrey et al. 2002).

### **6.5 Individuelle Fälle zurückführbar auf ein „aberrantes“ Ionenkanal-expressionsprofil?**

Studien der Genexpression haben es ermöglicht, eine Reihe von Genen zu identifizieren, die mit dem klinischen Verlauf assoziiert sind. So konnten zum Beispiel in einer anderen Klasse von Tumoren, den Medulloblastomen, die normalerweise eine niedrige Ionenkanalexpression zeigen, Fälle mit einer „aberranten“ hohen Ionenkanalexpression mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht werden (Pomeroy et al. 2002). „Aberrant“ meint allgemein ein Ionenkanalprofil, das vom „üblichen“, bisher mir Regelmäßigkeit bei entsprechenden Tumorentitäten gefundenen Expressionsmuster abweicht. Die Entdeckung solcher Fälle ist klinisch von Bedeutung.

In Gliomen wurden solche „aberranten“ Profile hinsichtlich der Natriumkanalexpression gefunden, allerdings bisher nicht bezüglich einer eventuell besseren Prognose untersucht (Schrey et al. 2002). In unseren Untersuchungen zeigten zwei Glioblastome (#15 und #16) ein derartiges „aberrantes“ Kanalmuster, nämlich hohe hEAG1 und niedrige ERG1 Expression, während die anderen Glioblastome das gegensätzliche Muster zeigten. Ob es sich dabei tatsächlich um besondere Einzelfälle handelt oder lediglich um statistische Ausreißer, kann auf Grund der geringen Stichprobenumfänge nicht mit Sicherheit gesagt werden. Daher ist eine Untersuchung an größeren Probenkontingenten sinnvoll, um eine mögliche Signifikanz dieser Beobachtungen zu belegen. Des Weiteren

sollte in folgenden Studien der Überlegung nachgegangen werden, ob eine differenzierte Ionenkanalexpression von Gliomen mit einer günstigeren Prognose in Verbindung gebracht werden kann.

## 7 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

1. Drei der von uns untersuchten Isoformen spannungsabhängiger Kaliumkanäle – Kv1.5, hEAG1 und hEARG1 – zeigten in Gliomen unterschiedlicher Malignität und Histologie eine differenzielle Expression. Allerdings konnte eine hochsignifikante Abhängigkeit der Expression vom Malignitätsgrad nicht nachgewiesen werden. Die Bedeutung der Kanalexpression bleibt somit ungeklärt. Es lassen sich jedoch folgende Hypothesen ableiten: So ergeben sich auf Grund unserer Untersuchungen Hinweise darauf, dass die Kanäle eher mit *Zelldifferenzierungs-* als mit *-ent*differenzierungsvorgängen der Tumoren in Verbindung stehen könnten. Bemerkenswert ist die Feststellung einer niedrigen Expression in den hochgradigen Tumoren, da sie andeutet, dass die Kanäle für ein malignes Wachstum nicht benötigt werden. Als "positive" Marker für hochgradige Hirntumoren oder generell als Malignitätsmarker eignen sich die untersuchten Kanäle nicht. Denkbar wäre eine Verwendung als "negative" Marker im Hinblick auf die beschriebene Suppression der intrinsischen Kanalexpression in höhergradigen Gliomen. Aufgrund der differenziellen Expression kann man jedenfalls nicht von einem bloßen "Epiphänomen" sprechen.
2. Eine klare Zuordnung eines bestimmten Kanaltypus für eine bestimmte Hirntumorentität oder einen Differenzierungsgrad von Tumorzellen sowie ein spezifisches Kanalmuster für einen bestimmten Hirntumor ergibt sich anhand unserer Untersuchungen nicht.
3. Zur Vervollständigung der erhobenen Daten sind Untersuchungen zur zellulären Auflösung der Kanalexpression und Betrachtungen auf Proteinebene notwendig. Dabei ist die Durchführung beispielsweise von in-situ-Hybridisierungen und immunhistochemischen Experimenten anhand gegen die Kanalproteine gerichteten Antikörper lohnenswert.
4. Weitere aufschlussreiche Ergebnisse kann man von Untersuchungen mittels Chip-technologie erwarten. Es wäre interessant zu prüfen, ob Kanalproteine unter den Clustern sind, die eine Diskriminierung von "normal" versus "Tumor" und von "gut-

artig" versus "maligne" erlauben. Dies ermöglicht perspektivisch sicher weitreichendere Aussagen hinsichtlich der Bedeutung der Kanäle.

5. Perspektivisch können die so ermittelten bzw. ergänzten und vertieften Kanalprofile von operiertem Tumorgewebe als Basis für eine Krebstherapie dienen, bei der Kanalprofile als „Targets“ fungieren (vgl. Conti 2004).

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Akhtar, S., McIntosh, P., Bryan-Sisneros, A., Barratt, L., Robertson, B. und Dolly, J. O. (1999). A functional spliced-variant of beta 2 subunit of Kv1 channels in C6 glioma cells and reactive astrocytes from rat lesioned cerebellum. *Biochemistry*, 38 (51): 16984-16992.
- Akopian, G., Kuprijanova, E., Kressin, K. und Steinhuser, C. (1997). Analysis of ion channel expression by astrocytes in red nucleus brain stem slices of the rat. *Glia*, 19 (3): 234-246.
- Allen, D. H., Lepple-Wienhues, A. und Cahalan, M. D. (1997). Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Membr Biol*, 155 (1): 27-34.
- Arcangeli, A., Rosati, B., Cherubini, A., Crociani, O., Fontana, L., Passani, B., Wanke, E. und Olivotto, M. (1998). Long-term exposure to retinoic acid induces the expression of IRK1 channels in HERG channel-endowed neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 244 (3): 706-711.
- Arcangeli, A., Rosati, B., Cherubini, A., Crociani, O., Fontana, L., Ziller, C., Wanke, E. und Olivotto, M. (1997). HERG- and IRK-like inward rectifier currents are sequentially expressed during neuronal development of neural crest cells and their derivatives. *Eur J Neurosci*, 9 (12): 2596-2604.
- Arcangeli, A., Rosati, B., Crociani, O., Cherubini, A., Fontana, L., Passani, B., Wanke, E. und Olivotto, M. (1999). Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: potentiating effects of BDNF. *J Neurobiol*, 40 (2): 214-225.
- Armstrong, C. M. und Bezanilla, F. (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*, 242 (5398): 459-461.
- Attali, B., Wang, N., Kolot, A., Sobko, A., Cherepanov, V. und Soliven, B. (1997). Characterization of delayed rectifier Kv channels in oligodendrocytes and progenitor cells. *J Neurosci*, 17 (21): 8234-8245.
- Barres, B. A., Chun, L. L. und Corey, D. P. (1990). Ion channels in vertebrate glia. *Annu Rev Neurosci*, 13: 441-474.
- Bauer, C. K. und Schwarz, J. R. (2001). Physiology of EAG K<sup>+</sup> channels. *J Membr Biol*, 182 (1): 1-15.
- Bauer, C. K., Wulfsen, I., Schafer, R., Glassmeier, G., Wimmers, S., Flitsch, J., Ludecke, D. K. und Schwarz, J. R. (2003). HERG K(+) currents in human prolactin-secreting adenoma cells. *Pflugers Arch*, 445 (5): 589-600.



- Beeton, C., Wulff, H., Barbaria, J., Clot-Faybesse, O., Pennington, M., Bernard, D., Cahalan, M. D., Chandy, K. G. und Beraud, E. (2001). Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (24): 13942-13947.
- Bekele-Arcuri, Z., Matos, M. F., Manganas, L., Strassle, B. W., Monaghan, M. M., Rhodes, K. J. und Trimmer, J. S. (1996). Generation and characterization of subtype-specific monoclonal antibodies to K<sup>+</sup> channel alpha- and beta-subunit polypeptides. *Neuropharmacology*, 35 (7): 851-865.
- Bianchi, L., Wible, B., Arcangeli, A., Taglialatela, M., Morra, F., Castaldo, P., Crociani, O., Rosati, B., Faravelli, L., Olivotto, M. und Wanke, E. (1998). hERG encodes a K<sup>+</sup> current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Res*, 58 (4): 815-822.
- Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Liu, J. H., Bader, C. R., Bernheim, L. und Fischer-Lougheed, J. (1998). An ether -a-go-go K<sup>+</sup> current, Ih-eag, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts. *J Physiol*, 512 ( Pt 2): 317-323.
- Binggeli, R. und Weinstein, R. C. (1986). Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J Theor Biol*, 123 (4): 377-401.
- Bordey, A., Feltz, P. und Trouslard, J. (1995). Kinetics of A-currents in sympathetic preganglionic neurones and glial cells. *Neuroreport*, 7 (1): 37-40.
- Bordey, A. und Sontheimer, H. (1997). Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J Neurophysiol*, 78 (1): 461-477.
- Bordey, A. und Sontheimer, H. (1998a). Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells In situ: enigma of spiking glial cells. *J Neurophysiol*, 79 (5): 2782-2793.
- Bordey, A. und Sontheimer, H. (1998b). Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. *Epilepsy Res*, 32 (1-2): 286-303.
- Boucsein, C., Kettenmann, H. und Nolte, C. (2000). Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur J Neurosci*, 12 (6): 2049-2058.
- Brismar, T. (1995). Physiology of transformed glial cells. *Glia*, 15 (3): 231-243.
- Brismar, T. und Collins, V. P. (1989a). Inward rectifying potassium channels in human malignant glioma cells. *Brain Res*, 480 (1-2): 249-258.
- Brismar, T. und Collins, V. P. (1989b). Potassium and sodium channels in human malignant glioma cells. *Brain Res*, 480 (1-2): 259-267.

- Brismar, T. und Collins, V. P. (1989c). Potassium channels in human glioma cells. *Pflugers Arch*, 414 Suppl 1: S137-138.
- Brodoehl, S. (2005). Expression von BK-Kanälen in humanen Gliomen. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Brüggemann, A., Pardo, L. A., Stuhmer, W. und Pongs, O. (1993). Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> and modulated by cAMP. *Nature*, 365 (6445): 445-448.
- Brundel, B. J., Van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Wietes, M., Grandjean, J. G., Wilde, A. A., Van Gilst, W. H. und Crijns, H. J. (2001). Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K<sup>+</sup> channels. *J Am Coll Cardiol*, 37 (3): 926-932.
- Bychkov, R., Glowinski, J. und Giaume, C. (2001). Sequential and opposite regulation of two outward K(+) currents by ET-1 in cultured striatal astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281 (4): C1373-1384.
- Cahalan, M. D. und Chandy, K. G. (1997). Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol*, 8 (6): 749-756.
- Cahalan, M. D., Wulff, H. und Chandy, K. G. (2001). Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol*, 21 (4): 235-252.
- Canady, K. S., Ali-Osman, F. und Rubel, E. W. (1990). Extracellular potassium influences DNA and protein syntheses and glial fibrillary acidic protein expression in cultured glial cells. *Glia*, 3 (5): 368-374.
- Chandy, K. G. (1991). Simplified gene nomenclature. *Nature*, 352 (6330): 26.
- Cherubini, A., Taddei, G. L., Crociani, O., Paglierani, M., Buccoliero, A. M., Fontana, L., Noci, I., Borri, P., Borrani, E., Giachi, M., Becchetti, A., Rosati, B., Wanke, E., Olivotto, M. und Arcangeli, A. (2000). HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer*, 83 (12): 1722-1729.
- Chin, L. S., Park, C. C., Zitnay, K. M., Sinha, M., DiPatri, A. J., Jr., Perillan, P. und Simard, J. M. (1997). 4-Aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K<sup>+</sup> channel in malignant astrocytoma cell lines. *J Neurosci Res*, 48 (2): 122-127.
- Chittajallu, R., Chen, Y., Wang, H., Yuan, X., Ghiani, C. A., Heckman, T., McBain, C. J. und Gallo, V. (2002). Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (4): 2350-2355.

- Chiu, S. Y. und Wilson, G. F. (1989). The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in Wallerian degeneration of explant rabbit sciatic nerves. *J Physiol*, 408: 199-222.
- Chung, Y. H., Joo, K. M., Nam, R. H., Kim, Y. S., Lee, W. B. und Cha, C. I. (2005). Immunohistochemical study on the distribution of the voltage-gated potassium channels in the gerbil cerebellum. *Neurosci Lett*, 374 (1): 58-62.
- Chung, Y. H., Kim, H. S., Shin, C. M., Kim, M. J. und Cha, C. I. (2001). Immunohistochemical study on the distribution of voltage-gated K(+) channels in rat brain following transient focal ischemia. *Neurosci Lett*, 308 (3): 157-160.
- Chvatal, A., Pastor, A., Mauch, M., Sykova, E. und Kettenmann, H. (1995). Distinct populations of identified glial cells in the developing rat spinal cord slice: ion channel properties and cell morphology. *Eur J Neurosci*, 7 (1): 129-142.
- Coleman, S. K., Newcombe, J., Pryke, J. und Dolly, J. O. (1999). Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *J Neurochem*, 73 (2): 849-858.
- Conti, M. (2004). Targeting K<sup>+</sup> channels for cancer therapy. *J Exp Ther Oncol*, 4 (2): 161-166.
- Crociani, O., Cherubini, A., Piccini, E., Polvani, S., Costa, L., Fontana, L., Hofmann, G., Rosati, B., Wanke, E., Olivotto, M. und Arcangeli, A. (2000). *erg* gene(s) expression during development of the nervous and muscular system of quail embryos. *Mech Dev*, 95 (1-2): 239-243.
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D. und Keating, M. T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*, 80 (5): 795-803.
- D'Ambrosio, R., Maris, D. O., Grady, M. S., Winn, H. R. und Janigro, D. (1999). Impaired K(+) homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J Neurosci*, 19 (18): 8152-8162.
- DeAngelis, L. M. (2001). Brain tumors. *N Engl J Med*, 344 (2): 114-123.
- DeCoursey, T. E., Kim, S. Y., Silver, M. R. und Quandt, F. N. (1996). Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages. *J Membr Biol*, 152 (2): 141-157.
- Deutsch, C. und Chen, L. Q. (1993). Heterologous expression of specific K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (21): 10036-10040.
- Dolly, J. O. und Parcej, D. N. (1996). Molecular properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J Bioenerg Biomembr*, 28 (3): 231-253.

- Dubois, J. M. und Rouzaille-Dubois, B. (1993). Role of potassium channels in mitogenesis. *Prog Biophys Mol Biol*, 59 (1): 1-21.
- Emmi, A., Wenzel, H. J., Schwartzkroin, P. A., Taglialatela, M., Castaldo, P., Bianchi, L., Nerbonne, J., Robertson, G. A. und Janigro, D. (2000). Do glia have heart? Expression and functional role for ether-a-go-go currents in hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, 20 (10): 3915-3925.
- Engeland, B., Neu, A., Ludwig, J., Roeper, J. und Pongs, O. (1998). Cloning and functional expression of rat ether-a-go-go-like K<sup>+</sup> channel genes. *J Physiol*, 513 ( Pt 3): 647-654.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W. und Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25 (3): 533-535.
- Felipe, A., Snyders, D. J., Deal, K. K. und Tamkun, M. M. (1993). Influence of cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression on alanine transport, Rb<sup>+</sup> uptake, and cell volume. *Am J Physiol*, 265 (5 Pt 1): C1230-1238.
- Feng, J., Wible, B., Li, G.R., Wang, Z. und Nattel, S. (1997). Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res*, 80 (4): 572-9.
- Gallo, V., Zhou, J. M., McBain, C. J., Wright, P., Knutson, P. L. und Armstrong, R. C. (1996). Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K<sup>+</sup> channel block. *J Neurosci*, 16 (8): 2659-2670.
- Ganetzky, B., Robertson, G. A., Wilson, G. F., Trudeau, M. C. und Titus, S. A. (1999). The eag family of K<sup>+</sup> channels in Drosophila and mammals. *Ann N Y Acad Sci*, 868: 356-369.
- Ganetzky, B. und Titus, S. A. (2000). Polynucleotides encoding herg-3 potassium channel. Patent: USA 5, 98608116, Nov. 1999, *Wisconsin Alumni Research Foundation*, Madison, WI, USA.
- Goldin, A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*, 63: 871-894.
- Grissmer, S., Nguyen, A. N., Aiyar, J., Hanson, D. C., Mather, R. J., Gutman, G. A., Karmilowicz, M. J., Auperin, D. D. und Chandy, K. G. (1994). Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol*, 45 (6): 1227-1234.
- Gutman, G. A. und Chandy, K. G. (1993). Nomenclature for vertebrate voltage-gated K<sup>+</sup>-channels. *Sem. Neurosci*, 5: 101-106.

Gutman, G. A., Chandy, K. G., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., Covarrubias, M., Desir, G. V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M. L., Grissmer, S., Jan, L. Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H. A., McKinnon, D., Nichols, C. G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M. M., Vandenberg, C. A., Wei, A., Wulff, H. und Wymore, R. S. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev*, 55 (4): 583-586.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. und MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys J*, 66 (4): 1061-1067.

Helms, L. M., Felix, J. P., Bugianesi, R. M., Garcia, M. L., Stevens, S., Leonard, R. J., Knaus, H. G., Koch, R., Wanner, S. G., Kaczorowski, G. J. und Slaughter, R. S. (1997). Margatoxin binds to a homomultimer of K(V)1.3 channels in Jurkat cells. Comparison with K(V)1.3 expressed in CHO cells. *Biochemistry*, 36 (12): 3737-3744.

Hille, B. (1992). Ionic channels in excitable membranes. Zweite Auflage. Sunderland, Mass.: *Sinauer Associates, Inc.*

Hirdes, W., Schweizer, M., Schuricht, K. S., Guddat, S. S., Wulfsen, I., Bauer, C. K. und Schwarz, J. R. (2005). Fast erg K<sup>+</sup> currents in rat embryonic serotonergic neurones. *J Physiol*, 564 (Pt 1): 33-49.

Ishiuchi, S., Nakazato, Y., Iino, M., Ozawa, S., Tamura, M. und Ohye, C. (1998). In vitro neuronal and glial production and differentiation of human central neurocytoma cells. *J Neurosci Res*, 51 (4): 526-535.

Jacobson, A. (1987). Purification and fractionation of poly(A)<sup>+</sup> RNA. *Methods Enzymol*, 152: 254-261.

Jänisch, W., Schreiber, D. und Güthert, H. (1988). Tumoren des Nervensystems. Neuropathologie. Stuttgart: *Gustav-Fischer-Verlag*.

Jensen, B. S., Odum, N., Jorgensen, N. K., Christophersen, P. und Olesen, S. P. (1999). Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca(2<sup>+</sup>)-activated K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (19): 10917-10921.

Jou, I., Pyo, H., Chung, S., Jung, S. Y., Gwag, B. J. und Joe, E. H. (1998). Expression of Kv1.5 K<sup>+</sup> channels in activated microglia in vivo. *Glia*, 24 (4): 408-414.

Kamb, A., Iverson, L. E. und Tanouye, M. A. (1987). Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell*, 50 (3): 405-413.

Khanna, R., Chang, M. C., Joiner, W. J., Kaczmarek, L. K. und Schlichter, L. C. (1999). hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem*, 274 (21): 14838-14849.

Kleihues, P. und Cavenee, W. K. (2000). Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon: *IARC Press (International Agency for Research on Cancer)*.

Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C. und Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61 (3): 215-225, Diskussion 226-219.

Kleihues, P. und Ohgaki, H. (2000). Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol*, 28 (1): 164-170.

Kleihues, P., Schauble, B., zur Hausen, A., Esteve, J. und Ohgaki, H. (1997). Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol*, 150 (1): 1-13.

Kleihues, P. und Sobin, L. H. (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer*, 88 (12): 2887.

Knutson, P., Ghiani, C. A., Zhou, J. M., Gallo, V. und McBain, C. J. (1997). K<sup>+</sup> channel expression and cell proliferation are regulated by intracellular sodium and membrane depolarization in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci*, 17 (8): 2669-2682.

Koller, H., Allert, N., Oel, D., Stoll, G. und Siebler, M. (1998). TNF alpha induces a protein kinase C-dependent reduction in astroglial K<sup>+</sup> conductance. *Neuroreport*, 9 (7): 1375-1378.

Konishi, T. (1989). Voltage-dependent potassium channels in cultured mammalian Schwann cells. *Brain Res*, 499 (2): 273-280.

Koo, G. C., Blake, J. T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotina, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D., Jr., Cunningham, P., Wunderler, D. L., McManus, O. B., Slaughter, R., Bugianesi, R., Felix, J., Garcia, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N. H., Springer, M. S. und Feeney, W. (1997). Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol*, 158 (11): 5120-5128.

Kotecha, S. A. und Schlichter, L. C. (1999). A Kv1.5 to Kv1.3 switch in endogenous hippocampal microglia and a role in proliferation. *J Neurosci*, 19 (24): 10680-10693.

Labrakakis, C., Patt, S., Weydt, P., Cervos-Navarro, J., Meyer, R. und Kettenmann, H. (1997). Action potential-generating cells in human glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56 (3): 243-254.

Lang, F., Busch, G. L. und Volkl, H. (1998). The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem*, 8 (1-2): 1-45.

Lee, Y. S., Sayeed, M. M. und Wurster, R. D. (1993). Inhibition of cell growth by K<sup>+</sup> channel modulators is due to interference with agonist-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Cell Signal*, 5 (6): 803-809.

- Lepple-Wienhues, A., Berweck, S., Bohmig, M., Leo, C. P., Meyling, B., Garbe, C. und Wiederholt, M. (1996). K<sup>+</sup> channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J Membr Biol*, 151 (2): 149-157.
- Levite, M., Cahalon, L., Peretz, A., HersHKoviz, R., Sobko, A., Ariel, A., Desai, R., At-tali, B. und Lider, O. (2000). Extracellular K(+) and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and beta1 integrins. *J Exp Med*, 191 (7): 1167-1176.
- Lewis, R. S. und Cahalan, M. D. (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 13: 623-653.
- Li, L., Head, V. und Timpe, L. C. (2001). Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia*, 33 (1): 57-71.
- Li, M., Unwin, N., Stauffer, K.A., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1994). Images of purified Shaker potassium channels. *Curr Biol*, 4(2):110-5.
- Louis, D. N., Holland, E. C. und Cairncross, J. G. (2001). Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol*, 159 (3): 779-786.
- Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Bruggemann, A., Pardo, L. A., Marquardt, A., Stuhmer, W. und Pongs, O. (1994). Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether-a-go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the Drosophila channel and its mammalian counterpart. *Embo J*, 13 (19): 4451-4458.
- Ludwig, J., Weseloh, R., Karschin, C., Liu, Q., Netzer, R., Engeland, B., Stansfeld, C. und Pongs, O. (2000). Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-a-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Mol Cell Neurosci*, 16 (1): 59-70.
- Ma, W., Zhang, L., Xing, G., Hu, Z., Iwasa, K. H. und Clay, J. R. (1998). Prenatal expression of inwardly rectifying potassium channel mRNA (Kir4.1) in rat brain. *Neuro-report*, 9 (2): 223-227.
- MacDonald, R. J., Swift, G. H., Przybyla, A. E. und Chirgwin, J. M. (1987). Isolation of RNA using guanidinium salts. *Methods Enzymol*, 152: 219-227.
- MacFarlane, S. N. und Sontheimer, H. (1997). Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis in vitro. *J Neurosci*, 17 (19): 7316-7329.
- MacFarlane, S. N. und Sontheimer, H. (2000a). Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia*, 30 (1): 39-48.
- MacFarlane, S. N. und Sontheimer, H. (2000b). Modulation of Kv1.5 currents by Src tyrosine phosphorylation: potential role in the differentiation of astrocytes. *J Neurosci*, 20 (14): 5245-5253.

- MacVicar, B. A. (1984). Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science*, 226 (4680): 1345-1347.
- McManus, O. B. (1991). Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J Bioenerg Biomembr*, 23 (4): 537-560.
- McNamara, N. M., Averill, S., Wilkin, G. P., Dolly, J. O. und Priestley, J. V. (1996). Ultrastructural localization of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel alpha subunit (KV 1.2) in the rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, 8 (4): 688-699.
- Meyer, R. und Heinemann, S. H. (1998). Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol*, 508 ( Pt 1): 49-56.
- Meyer, R., Schonherr, R., Gavrilova-Ruch, O., Wohlrab, W. und Heinemann, S. H. (1999). Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J Membr Biol*, 171 (2): 107-115.
- Miller, C. (1991). 1990: annus mirabilis of potassium channels. *Science*, 252 (5010): 1092-1096.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1: 263-273.
- Newman, E. A., Kettenmann, H. und Ransom, B. R. (1995). Glial cell regulation of extracellular potassium. *Neuroglia*: 717-713.
- Nilius, B. und Droogmans, G. (1994). A role for K<sup>+</sup> channels in cell proliferation. *News Physiol Sci*, 9: 105-110.
- Nilius, B., Schwarz, G. und Droogmans, G. (1993). Control of intracellular calcium by membrane potential in human melanoma cells. *Am J Physiol*, 265 (6 Pt 1): C1501-1510.
- Nörenberg, W., Appel, K., Bauer, J., Gebicke-Haerter, P. J. und Illes, P. (1993). Expression of an outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel in rat microglia cultivated on teflon. *Neurosci Lett*, 160 (1): 69-72.
- Nörenberg, W., Gebicke-Haerter, P. J. und Illes, P. (1992). Inflammatory stimuli induce a new K<sup>+</sup> outward current in cultured rat microglia. *Neurosci Lett*, 147 (2): 171-174.
- Occhiodoro, T., Bernheim, L., Liu, J. H., Bijlenga, P., Sinnreich, M., Bader, C. R. und Fischer-Lougheed, J. (1998). Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett*, 434 (1-2): 177-182.
- Ouadid-Ahidouch, H., Le Bourhis, X., Roudbaraki, M., Toillon, R. A., Delcourt, P. und Prevarskaya, N. (2001). Changes in the K<sup>+</sup> current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K<sup>+</sup> channel. *Receptors Channels*, 7 (5): 345-356.



- Pallotta, B. S., Hepler, J. R., Oglesby, S. A. und Harden, T. K. (1987). A comparison of calcium-activated potassium channel currents in cell-attached and excised patches. *J Gen Physiol*, 89 (6): 985-997.
- Pancrazio, J. J., Ma, W., Grant, G. M., Shaffer, K. M., Kao, W. Y., Liu, Q. Y., Manos, P., Barker, J. L. und Stenger, D. A. (1999). A role for inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in differentiation of NG108-15 neuroblastoma x glioma cells. *J Neurobiol*, 38 (4): 466-474.
- Papa, M., Boscia, F., Canitano, A., Castaldo, P., Sellitti, S., Annunziato, L. und Tagliatela, M. (2003). Expression pattern of the ether-a-gogo-related (ERG) K<sup>+</sup> channel-encoding genes ERG1, ERG2, and ERG3 in the adult rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 466 (1): 119-135.
- Pappas, C. A. und Ritchie, J. M. (1998). Effect of specific ion channel blockers on cultured Schwann cell proliferation. *Glia*, 22 (2): 113-120.
- Pardo, L. A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S. und Stuhmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *Embo J*, 18 (20): 5540-5547.
- Patt, S., Labrakakis, C., Bernstein, M., Weydt, P., Cervos-Navarro, J., Nisch, G. und Kettenmann, H. (1996). Neuron-like physiological properties of cells from human oligodendroglial tumors. *Neuroscience*, 71 (2): 601-611.
- Patt, S., Steenbeck, J., Hochstetter, A., Kraft, R., Huonker, R., Haueisen, J., Haberland, N., Ebmeier, K., Hliscs, R., Fiehler, J., Nowak, H. und Kalff, R. (2000). Source localization and possible causes of interictal epileptic activity in tumor-associated epilepsy. *Neurobiol Dis*, 7 (4): 260-269.
- Patt, S., Preußat K., Beetz C., Kraft R., Schrey M., Kalff R., Schönherr K., Heinemann SH. (2004). Expression of *ether à go-go* potassium channels in human gliomas. *Neurosci Lett*, 368 (3): 249-53.
- Paulus, W. (2002). Tumoren. In: Pfeiffer, J., Schröder, J. M. und Paulus W. (Hrsg.). Neuropathologie- Morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur. 3. Auflage. Berlin: Springer-Verlag.
- Perillan, P. R., Li, X. und Simard, J. M. (1999). K(+) inward rectifier currents in reactive astrocytes from adult rat brain. *Glia*, 27 (3): 213-225.
- Pomeroy, S. L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L. M., Angelo, M., McLaughlin, M. E., Kim, J. Y., Goumnerova, L. C., Black, P. M., Lau, C., Allen, J. C., Zagzag, D., Olson, J. M., Curran, T., Wetmore, C., Biegel, J. A., Poggio, T., Mukherjee, S., Rifkin, R., Califano, A., Stolovitzky, G., Louis, D. N., Mesirov, J. P., Lander, E. S. und Golub, T. R. (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature*, 415 (6870): 436-442.

- Quandt, F. N. und MacVicar, B. A. (1986). Calcium activated potassium channels in cultured astrocytes. *Neuroscience*, 19 (1): 29-41.
- Radner, H., Blumcke, I., Reifenberger, G. und Wiestler, O. D. (2002). [The new WHO classification of tumors of the nervous system 2000. Pathology and genetics]. *Pathologe*, 23 (4): 260-283.
- Ransom, C. B., O'Neal, J. T. und Sontheimer, H. (2001). Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells. *J Neurosci*, 21 (19): 7674-7683.
- Ransom, C. B. und Sontheimer, H. (1995). Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol*, 73 (1): 333-346.
- Ransom, C. B., Sontheimer, H. und Janigro, D. (1996). Astrocytic inwardly rectifying potassium currents are dependent on external sodium ions. *J Neurophysiol*, 76 (1): 626-630.
- Rouzaire-Dubois, B. und Dubois, J. M. (1998). K<sup>+</sup> channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J Physiol*, 510 ( Pt 1): 93-102.
- Rouzaire-Dubois, B., Milandri, J. B., Bostel, S. und Dubois, J. M. (2000). Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells. *Pflugers Arch*, 440 (6): 881-888.
- Roy, M. L., Saal, D., Perney, T., Sontheimer, H., Waxman, S. G. und Kaczmarek, L. K. (1996). Manipulation of the delayed rectifier Kv1.5 potassium channel in glial cells by antisense oligodeoxynucleotides. *Glia*, 18 (3): 177-184.
- Saganich, M. J., Machado, E. und Rudy, B. (2001). Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K<sup>+</sup> channels in brain. *J Neurosci*, 21 (13): 4609-4624.
- Saganich, M. J., Vega-Saenz de Miera, E., Nadal, M. S., Baker, H., Coetzee, W. A. und Rudy, B. (1999). Cloning of components of a novel subthreshold-activating K(+) channel with a unique pattern of expression in the cerebral cortex. *J Neurosci*, 19 (24): 10789-10802.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, D. A., Fiddes, I., Thompson, D. M., Philpott, M. P., Westgate, G. E. und Kealey, T. (1996). In the absence of streptomycin, minoxidil potentiates the mitogenic effects of fetal calf serum, insulin-like growth factor 1, and platelet-derived growth factor on NIH 3T3 fibroblasts in a K<sup>+</sup> channel-dependent fashion. *J Invest Dermatol*, 107 (2): 229-234.

- Schlichter, L. C., Sakellaropoulos, G., Ballyk, B., Pennefather, P. S. und Phipps, D. J. (1996). Properties of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels and their involvement in proliferation of rat microglial cells. *Glia*, 17 (3): 225-236.
- Schmidt, K., Eulitz, D., Veh, R. W., Kettenmann, H. und Kirchhoff, F. (1999). Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the shaker family (Kv1) in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res*, 843 (1-2): 145-160.
- Schönherr, R., Gessner, G., Lober, K. und Heinemann, S. H. (2002a). Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels. *FEBS Lett*, 514 (2-3): 204-208.
- Schönherr, R., Lober, K. und Heinemann, S. H. (2000). Inhibition of human ether a go-go potassium channels by Ca(2+)/calmodulin. *Embo J*, 19 (13): 3263-3271.
- Schönherr, R., Mannuzzu, L. M., Isacoff, E. Y. und Heinemann, S. H. (2002b). Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 35 (5): 935-949.
- Schrey, M., Codina, C., Kraft, R., Beetz, C., Kalff, R., Wolfl, S. und Patt, S. (2002). Molecular characterization of voltage-gated sodium channels in human gliomas. *Neuroreport*, 13 (18): 2493-2498.
- Schwarz, J. R. und Bauer, C. K. (1999). Ionic mechanisms underlying TRH-induced prolactin secretion in rat lactotrophs. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 85 (1): 195-204.
- Schwarz, J. R. und Bauer, C. K. (2004). Functions of erg K<sup>+</sup> channels in excitable cells. *J Cell Mol Med*, 8 (1): 22-30.
- Shao, X. D., Wu, K. C., Hao, Z. M., Hong, L., Zhang, J. und Fan, D. M. (2005). The Potent Inhibitory Effects of Cisapride, a Specific Blocker for Human Ether-a-Go-Go-Related Gene (HERG) Channel, on Gastric Cancer Cells. *Cancer Biol Ther*, 4 (3)
- Shi, W., Wymore, R. S., Wang, H. S., Pan, Z., Cohen, I. S., McKinnon, D. und Dixon, J. E. (1997). Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. *J Neurosci*, 17 (24): 9423-9432.
- Shi, W., Wang, H.S., Pan, Z., Wymore, R.S., Cohen, I.S., McKinnon, D. und Dixon, J.E. (1998). Cloning of a mammalian elk potassium channel gene and EAG mRNA distribution in rat sympathetic ganglia. *J Physiol*, 511 (Pt3): 675-82.
- Smith, G. A., Tsui, H. W., Newell, E. W., Jiang, X., Zhu, X. P., Tsui, F. W. und Schlichter, L. C. (2002). Functional up-regulation of HERG K<sup>+</sup> channels in neoplastic hematopoietic cells. *J Biol Chem*, 277 (21): 18528-18534.
- Smith-Maxwell, C.J., Ledwell, J.L. und Aldrich, R.W. (1998). Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol*, 111(3): 399-420.

- Smith, P.M., Baukrowitz, T. und Yellen, G.(1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*, 379 (6568): 833-6.
- Snyders, D. J., Tamkun, M. M. und Bennett, P. B. (1993). A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol*, 101 (4): 513-543.
- Sobko, A., Peretz, A., Shirihi, O., Etkin, S., Cherepanova, V., Dagan, D. und Attali, B. (1998). Heteromultimeric delayed-rectifier K<sup>+</sup> channels in schwann cells: developmental expression and role in cell proliferation. *J Neurosci*, 18 (24): 10398-10408.
- Sontheimer, H. (1994). Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia*, 11 (2): 156-172.
- Sontheimer, H. und Waxman, S. G. (1993). Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J Neurophysiol*, 70 (5): 1863-1873.
- Stansfeld, C. E., Roper, J., Ludwig, J., Weseloh, R. M., Marsh, S. J., Brown, D. A. und Pongs, O. (1996). Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether-a-go-go channels in a stably transfected cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (18): 9910-9914.
- Stuhmer, W., Ruppersberg, J. P., Schroter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Giese, K. P., Perschke, A., Baumann, A. und Pongs, O. (1989). Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *Embo J*, 8 (11): 3235-3244.
- Swanson, R., Marshall, J., Smith, J. S., Williams, J. B., Boyle, M. B., Folander, K., Luneau, C. J., Antanavage, J., Oliva, C., Buhrow, S. A. und et al. (1990). Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron*, 4 (6): 929-939.
- Terlau, H., Ludwig, J., Steffan, R., Pongs, O., Stuhmer, W. und Heinemann, S. H. (1996). Extracellular Mg<sup>2+</sup> regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflugers Arch*, 432 (2): 301-312.
- Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B. und Robertson, G. A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science*, 269 (5220): 92-95.
- Uebele, V. N., England, S. K., Chaudhary, A., Tamkun, M. M. und Snyders, D. J. (1996). Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv beta 2.1 subunits. *J Biol Chem*, 271 (5): 2406-2412.
- Ullrich, N., Bordey, A., Gillespie, G. Y. und Sontheimer, H. (1998). Expression of voltage-activated chloride currents in acute slices of human gliomas. *Neuroscience*, 83 (4): 1161-1173.

- Van Wagoner, D.R., Pond, A.L., McCarthy, P.M., Trimmer, J.S. und Nerbonne, J.M. (1997). Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res*, 80 (6): 772-81.
- Veh, R. W., Lichtinghagen, R., Sewing, S., Wunder, F., Grumbach, I. M. und Pongs, O. (1995). Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci*, 7 (11): 2189-2205.
- Verkhatsky, A. und Steinhauser, C. (2000). Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev*, 32 (2-3): 380-412.
- Verma-Kurvari, S., Border, B. und Joho, R. H. (1997). Regional and cellular expression patterns of four K<sup>+</sup> channel mRNAs in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 46 (1-2): 54-62.
- Vicente, R., Escalada, A., Soler, C., Grande, M., Celada, A., Tamkun, M. M., Solsona, C. und Felipe, A. (2005). Pattern of Kv beta subunit expression in macrophages depends upon proliferation and the mode of activation. *J Immunol*, 174 (8): 4736-4744.
- Wang, H., Zhang, Y., Cao, L., Han, H., Wang, J., Yang, B., Nattel, S. und Wang, Z. (2002). HERG K<sup>+</sup> channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res*, 62 (17): 4843-4848.
- Warmke, J., Drysdale, R. und Ganetzky, B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science*, 252 (5012): 1560-1562.
- Warmke, J. W. und Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (8): 3438-3442.
- Whitaker, M. und Patel, R. (1990). Calcium and cell cycle control. *Development*, 108 (4): 525-542.
- White, J. A., McAlpine, P. J., Antonarakis, S., Cann, H., Eppig, J. T., Frazer, K., Frezal, J., Lancet, D., Nahmias, J., Pearson, P., Peters, J., Scott, A., Scott, H., Spurr, N., Talbot, C., Jr. und Povey, S. (1997). Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. *Genomics*, 45 (2): 468-471.
- Whitfield, J. F., Bird, R. P., Chakravarthy, B. R., Isaacs, R. J. und Morley, P. (1995). Calcium-cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter. *J Cell Biochem Suppl*, 22: 74-91.
- Wiestler, O. D. und von Deimling, A. (1995). Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung im Zentralen Nervensystem. *Neuroforum*, 2 :29-36.
- Wiestler, O. D. und Schmidt, M. C. (1998). Neuropathologie maligner Gliome. *Der Onkologe*, 4 (7):580-588.

Wonderlin, W. F. und Strobl, J. S. (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol*, 154 (2): 91-107.

Wulfsen, I., Hauber, H. P., Schiemann, D., Bauer, C. K. und Schwarz, J. R. (2000). Expression of mRNA for voltage-dependent and inward-rectifying K channels in GH3/B6 cells and rat pituitary. *J Neuroendocrinol*, 12 (3): 263-272.

Wymore, R. S., Gintant, G. A., Wymore, R. T., Dixon, J. E., McKinnon, D. und Cohen, I. S. (1997). Tissue and species distribution of mRNA for the IKr-like K<sup>+</sup> channel, *erg*. *Circ Res*, 80 (2): 261-268.

Yager, J., Richards, S., Hekmat-Scafe, D. S., Hurd, D. D., Sundaresan, V., Caprette, D. R., Saxton, W. M., Carlson, J. R. und Stern, M. (2001). Control of *Drosophila* perineurial glial growth by interacting neurotransmitter-mediated signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (18): 10445-10450.

Yang, N., George, A. L., Jr. und Horn, R. (1996). Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 16 (1): 113-122.

Yang, N. und Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*, 15 (1): 213-218.

Yao, X. und Kwan, H. Y. (1999). Activity of voltage-gated K<sup>+</sup> channels is associated with cell proliferation and Ca<sup>2+</sup> influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci*, 65 (1): 55-62.

Yu, S. P., Yeh, C. H., Sensi, S. L., Gwag, B. J., Canzoniero, L. M., Farhangrazi, Z. S., Ying, H. S., Tian, M., Dugan, L. L. und Choi, D. W. (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science*, 278 (5335): 114-117.

## 9 ANHANG

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Katja Preußat, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. S. Patt, Dr. rer. nat. C. Beetz, Dr. med. M. Schrey, Dipl.-Math. A. Brandstädt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 06.10. 2005

Katja Preußat, Verfasserin

## Lebenslauf

### ***Persönliche Daten:***

Name: Katja Preußat  
Geburtstag: 13.02.1979  
Geburtsort: Sondershausen  
Familienstand: ledig

### ***Schulbildung:***

1985 - 1991 POS „Wilhelm Pieck“ Sondershausen  
1991 - 1997 Staatliches Gymnasium Sondershausen  
1997 Abitur

### ***Studium:***

10/ 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
09/ 1999 Physikum  
08/ 2000 Erstes Staatsexamen  
09/ 2002 Zweites Staatsexamen  
10/ 2004 Drittes Staatsexamen

### ***Praktische Tätigkeiten:***

2000 - 2002 Famulaturen: in der Inneren Medizin am Kyffhäuserkreiskrankenhaus Sondershausen, in der Unfallchirurgie am Landeskrankenhaus Feldkirch (Österreich), der Allgemeinarztmedizin, Newmarket (Irland), in der Pathologie an der FSU Jena  
04/ 2003 – 03/ 2004 Praktisches Jahr in Jena (Dermatologie), Gemeindespital Riehen/ Schweiz (Allgemeine-, viszerale- und orthopädische Chirurgie), Thüringen-Kliniken „Georgius Agricola“ Rudolstadt (Innere Medizin)

### ***Beruflicher Werdegang:***

seit 01/ 2005 Assistenzärztin an der Klinik für Innere Medizin II, Abteilung Gastroenterologie-Hepatology-Infektiologie, Uniklinikum Jena

Jena, 06.10.2005

Katja Preußat



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. S. Patt für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie für die freundliche und motivierende Beratung und Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit selbst über Landesgrenzen hinweg. Ich bin ihm für die ausgezeichnete Betreuung sehr verbunden.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. D. Katenkamp für die Möglichkeit am Institut für Pathologie alle für die Promotion notwendigen experimentellen Arbeiten durchführen zu können.

Herrn Dr. med. Michael Schrey möchte ich für die ausführliche Einarbeitung in die Methodik, den vielen hilfreichen Hinweisen bei der Laborarbeit sowie für die unzählbaren Aufmunterungen und motivierenden Gespräche danken.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Beetz danke ich für die praktische Unterstützung der experimentellen Arbeiten und den zahlreichen Ratschlägen, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Einen großen Dank gilt auch Herrn PD Dr. rer. nat. Alexander Berndt für die großzügige Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und Computers. Bei ihm und Frau Dr. med. Petra Richter bedanke ich mich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre, der großartigen Hilfsbereitschaft sowie für die zahlreichen Ermutigungen und freundschaftlichen Gespräche.

Bei Frau Renate Klupsch möchte ich mich für die Hilfe bei der täglichen Laborroutine bedanken.

Frau Dipl.-Math. A. Brandstädt gilt mein Dank für die äußerst geduldige Beratung, den vielen Anregungen und Hinweisen bei den statistischen Auswertungen.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. Michael Brodhun für seine Hilfsbereitschaft und den zahlreichen freundlichen Ratschlägen zur Gestaltung der Arbeit danken.

Meiner Mutter, meiner Schwester und meinen Großeltern danke ich für ihre Unterstützung, Ermunterungen und ausdauernden Motivationen, mit denen sie zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.